

Aus dem Hygiene-Institut der Johannes Gutenberg-Universität Mainz
(Direktor: Prof. Dr. H. Kliewe)

EINFLUSS VON SERUM
UND SEINEN FRAKTIONEN AUF
DAS RESISTENZBILD VON STAPHYLOKOKKEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

INGEBORG WERNICKE

aus Worbis



MAINZ 1962

Dekan: Professor Dr. Dr. K. Lang
Referent: Professor Dr. Dr. G. Gillissen
Korreferent: Professor Dr. H. Kliewe
Tag der mündlichen Prüfung: 2. Februar 1962



GESAMTHERSTELLUNG:

DITTERS BÜRODIENST, MAINZ, Augustinerstraße 64-66

INHALT

1. Einleitung und Ziel der Arbeit
2. Beeinflussung der Chemoresistenz unter besonderer Berücksichtigung von Serumfaktoren und deren Bestandteilen (literarische Übersicht)

Eigene Versuche

3. Material und Methoden
 - a. Testkeime
 - b. Resistenzprüfung mit Dilutionstest
 - c. Gewinnung von Serum und seinen Fraktionen
 - d. Aufstellung von Wachstumskurven
 - e. Berechnung der Generationszeit
 - f. Bestimmung des O_2 -Verbrauchs
4. Besprechung der Ergebnisse
5. Diskussion
6. Zusammenfassung
7. Literatur



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554410_0020

1. EINLEITUNG UND ZIEL DER ARBEIT

Die Untersuchungen von Domagk bzw. Fleming führten zu der ganz neuen Ära der Sulfonamide bzw. Antibiotika. Mit diesen Stoffgruppen war es erstmals möglich, Infektionskrankheiten auf breiter Basis therapeutisch gut zu beeinflussen, und in manchen Fällen sogar zu koupieren.

Es zeigte sich aber bald, daß bei häufiger Anwendung dieser Wirkstoffe Resistenzerscheinungen bei den Krankheitserregern auftraten. Ursprünglich dachte man an die Möglichkeit einer Anpassung der Keime an die Wirkstoffe. Es dürfte jetzt wohl als gesichert angesehen werden, daß das Auftreten der resistenten Varianten durch Selektion primär resistenter Mutanten, welche nach einer errechenbaren Mutationsrate spontan auftreten, zustande kommt. Damit erhielten die Begriffe von Chemosensibilität und Chemoresistenz eine neue, klinisch bedeutungsvolle Problematik.

Es sei an dieser Stelle nicht auf die sehr zahlreichen Untersuchungen über das Wesen der Resistenz und der Resistenzbildung noch auf den Wirkungsmechanismus antibakterieller Stoffe eingegangen. Hier soll vornehmlich der Einfluß von Faktoren auf die Resistenzbildung untersucht werden, die im Organismus von Bedeutung sein können.

Ausgehend von in-vitro-Beobachtungen über den Einfluß von Milieufaktoren war es naheliegend, auch speziell an einen Einfluß von Serum bzw. von einzelnen Serumfraktionen zu denken.

Diese Frage wurde schon einmal - allerdings mit wenig Erfolg - angeschnitten. Hiller und Schach sowie Karte und Kröger beobachteten, daß Humanalbumin und γ -Globulin der Behringwerke, letzteres ebenfalls gewonnen aus menschlichem Serum, einen deutlichen bakteriostatischen Effekt besitzen. Nachträglich mußte aber festgestellt werden, daß diese antibakterielle Wirkung auf ein in den Präparaten vorhandenes Desinfiziens zurückzuführen ist. In manchen Blutsammelstellen wird dem Blut Cialit als Desinfiziens zugegeben, das sich sehr beständig an die SH-Gruppen des Albumins bindet und auch durch längere Dialyse nicht abgetrennt werden kann. Hiller und Schach führten dann nochmals ähnliche Versuche mit elektrophoretisch selbstgewonnenen Fraktionen von Albumin durch. Diese Fraktionen hatten keine antibakterielle Eigenschaft. In der vorliegenden Arbeit wurden im einzelnen der Einfluß von Humanserum (Hus), von Hammelserum (Has) sowie von Fraktionen dieser Seren unter Verwendung von verschiedenen gegen

Penicillin (= Pc) sensiblen und resistenten Stämmen von *M. pyogenes* var. aureus auf die Pc-Resistenz im Dilutionstest, auf die Generationszeit (= Gen. Zeit) und auf den O_2 -Verbrauch im Warburgversuch untersucht.

2. BEEINFLUSSUNG DER CHEMORESISTENZ UNTER BESONDERER BERÜCKSICHTIGUNG VON SERUMFAKTOREN UND DEREN BESTANDTEILEN (literarische Übersicht)

Verschiedene Autoren (Sevag und Rosanoff, Smolens und Vogt, Haas und Sevag, Schwartzman, Steers und Sevag, Gale und Rodwell, Rosanoff und Sevag, Bondi, Kornblum und de Phalle) stellten übereinstimmend fest, daß die Entwicklung der Resistenz der Keime gegen ein Antibiotikum abhängig ist. Ursprünglich sah man in der Resistenzbildung ein Phänomen der Adaptation. Man stellte sich also vor, daß eine gewisse Anzahl der Zellen der Gesamtpopulation dann resistent werden, wenn sie in Kontakt mit dem antibakteriellen Wirkstoff kommen. Es konnte dann aber recht überzeugend dargetan werden, daß ein Kontakt der Zellen mit dem Wirkstoff zur Resistenzbildung nicht erforderlich ist. Nach unserer heutigen Vorstellung handelt es sich bei der Resistenzbildung um die Entstehung präadaptiver Spontanmutanten, die in Gegenwart eines Antibiotikums zur Selektion kommen. Die Mutationsrate, d.h. die Zahl der Mutationen pro Zelle und Teilungszyklus kann für jeden Bakterienstamm unschwer definiert werden. Die Größe dieser Mutationsrate ist allerdings abhängig von einer ganzen Reihe Umweltfaktoren.

Gerade in diesem Zusammenhang interessieren natürlich die besonderen Stoffwechseleigentümlichkeiten von sensiblen und chemoresistenten Zellen. So zeigte beispielsweise ein gegen Chloramphenicol sensibler Parenteralstamm von *Pseud. fluorescens* im Gegensatz zur resistenten Variante eine verminderte Oxydation von Benzoat, L-Thyrosin und Malonat (Kushner). Streptomycinresistente Mutanten scheinen unfähig zu sein, Hämin zu synthetisieren; können aber zugeführtes Hämin oder Protoporphyrin zur Bildung bestimmter Dehydrogenasen verwenden (Übersicht s. Gillissen u. Gillissen).

Häufig wurde auch das Bedürfnis chemoresistenter Varianten für Aminosäuren untersucht. Es ist allerdings zu sagen, daß diese Resultate ebenso wie die über andere Stoffwechselercheinungen Verallgemeinerungen nur bedingt zulassen. Sulfothiazolresistente Staphylokokken können nur in Gegenwart von Glucose bestimmte essentielle Aminosäuren bilden (Steers u. Sevag).

Allerdings kann die Art dieser Aminosäuren von Stamm zu Stamm variieren. In Gegenwart von Glucose benötigen Streptomycinresistente Stämme von *E. coli* L-Lysin (Everson u. Baxman) oder auch Cystin, Asparaginsäure und Prolin (Rosanoff u. Sevag). Nach den Untersuchungen von Sevag u. Rosanoff, Lam u. Sevag erwerben *Staphylococcus aureus*-Stämme mit einer Streptomycinresistenz die Eigenschaft, in einem armen Medium ohne Phenylalanin und Asparaginsäure zu wachsen. Es scheint so zu sein, daß sich Bakterienstämme je nach der Art der Resistenz durch ein unterschiedliches Bedürfnis für Aminosäuren auszeichnen (Gale u. Rodwell). Zwischen Penicillinasebildenden (= Penase) und nicht-penasebildenden Stämmen, in jedem Fall aber Pc-resistenten Staphylokokkenstämme scheint in diesem Sinn kein wesentlicher Unterschied zu bestehen (Bondi u. Mitarbeiter, Boniece).

Geht man von der Vorstellung aus, daß bestimmte, an sich nicht antibakteriell wirkende Stoffe die Mutationsrate verändern, dann muß man zwangsläufig bei der Verwendung verschiedener Medien mehr oder minder häufig eine Resistenzentwicklung beobachten.

So sah man schon Unterschiede im erreichten Resistenzgrad, je nachdem ob flüssige oder feste Medien verwendet worden sind. Die Unterschiede in der Höhe des Resistenzanstiegs von Streptokokken gegen Streptomycin waren bis zum 130-Fachen des Ausgangswertes (Haight und Mitarbeiter). Im Gegensatz dazu sahen Mayer-Harting das Auftreten von Pc-resistenten Mutanten von *Staph. aureus* bei kleinen Pc-Konzentrationen nur in flüssigen Medien, nicht aber bei Verwendung von Agar. Ebenfalls mit Staphylokokken, aber mit der Chloramphenicolresistenz als Kriterium, sahen Ramsey und Padron nur in komplexen Medien, nicht aber in synthetischen Medien einen Resistenzanstieg.

Rosanoff und Sevag sagten, daß man je nach Zugabe oder Vermeidung bestimmter Aminosäuren das Auftreten von streptomycinresistenten Staphylokokken und *E. coli* vermeiden könne. Diese Angaben wurden prinzipiell von Haas und Sevag mit anderen Bakterienarten bestätigt. Smolens und Vogt führen eine milieubedingte unterschiedliche Häufigkeit resistenter Kolonien von *H. pertussis* auf den Nucleinsäuregehalt der verwendeten Medien zurück.

Schwartzman beobachtete bei *E. coli* und Salmonellen in einem basalen Medium ohne Aminosäure die höchste Empfindlichkeit gegen Pc, während eine Zugabe von Blutserum in bestimmten Konzentrationen, Hefeextrakt und

Caseinhydrolysat mit der Pc-Aktivität interferiert. Dies wird auf einen Antagonismus bestimmter Aminosäuren zurückgeführt. Nach demselben Autor wird der Pc-Effekt gegen gramnegative Keime durch Cystin, Arginin, Histidin und Hydroxyprolin unterdrückt. Die Feststellung, daß der Aminosäureantagonismus nicht primär in Beziehung steht mit der Beeinflussung der Wachstumsrate, ist wichtig.

Beim Resistenzgeschehen spielt die Generationszeit eine wichtige Rolle. Dies wird besonders deutlich bei der Abnahme der Chemoresistenz einer Keimpopulation durch Passagen in flüssigen, antibiotikafreien Medien. Da sich der sensible Anteil der Population schneller vermehrt als der resistente, kommt es zu einer Abnahme des Sensibilitäts- bzw. Resistenzwertes (Welsch). Der Populationsdruck kann deshalb auch als Selektionsdruck wirken. Das Umgekehrte ist natürlich auch möglich. Eine Mutante kann wegen einer besseren Anpassung an die Umweltfaktoren, trotz einer kleineren Wachstumsrate, den Parenteralstamm ersetzen.

Zu nennen wären die Untersuchungen von Goudlow, Tucher, Braun und Nika über die Bedeutung des Selektionswertes von Medien bei Brucellen. Diese Keime bilden in Gegenwart von L-Asparagin kein Alanin, weshalb auch keine Populationsänderung zustande kam. Es handelt sich dabei um Arbeiten über die Alaninresistenz von Brucellen. Wurde dem Medium aber D-Asparagin zugegeben, dann war ein gegenteiliges Resultat festzustellen. Auch die O_2 -Spannung soll einen Einfluß auf die Alaninbildung und damit auf die Populationsänderung haben (Goudlow und Mitarbeiter). Ebenso soll normales Serum, nicht Immunsrum, die Alaninbildung hemmen; antagonistisch beeinflufbar durch Magnesium- und Manganionen.

Hoerlein schrieb, daß die Anwesenheit von Rinderhirnextrakt das Auftreten von Nicht-S-Varianten von Staph. aureus begünstigt, während normales Rinderserum in dieser Hinsicht oder 5 mg Rinder- γ -Globulin pro ml Medium das Auftreten dieser Varianten hemmt und sogar den Effekt des Rinderhirnextraktes antagonistisch beeinflufst. Unterschiede in den Wachstumsraten wurden nicht beobachtet. Zu erwähnen bleiben noch einige Versuche aus dem Gebiet der Bakteriengenetik. Unter Transformation versteht man die gerichtete künstliche Induktion neuer genetischer Faktoren mittels isolierter DNS. Bei diesen, an sich leicht reproduzierbaren Versuchen fällt auf, daß die Transformationsfrequenz verhältnismäßig klein ist. Es ist bekannt, daß die Zahl der transformierbaren Zellen mit der Art der Stämme variiert und von der Populationsgröße abhängig ist. Man dachte deswegen daran, daß ein bestimmter Genotypus für die Transformierbarkeit erforderlich sei (Alexan-

der und Leidy). Bei Pneumokokken wurde daran gedacht, daß die Struktur der Zellwand für die Häufigkeit der Transformationen eine Rolle spielen kann (Braun) sowie an den Einfluß der DN-ase-Bildung oder an Milieufaktoren oder an einen dialysierbaren Serumfaktor bzw. an einen weiteren eiweißhaltigen Serumfaktor der Albuminfraction V von Rinderserum (McCarthy, Taylor und Avery, Hodgkiss und Ephrussi-Taylor).

Der Vollständigkeit halber sei noch kurz darauf hingewiesen, daß es bei Protozoen (Paramecien) und Hefen eine cytoplasmatische Vererbung serologischer Eigenschaften zu geben scheint (Sonneborn und Mitarbeiter). Transformationen dieser genetischen Charakteristika sind durch Antiserum zu erreichen. Auch Änderungen der Temperatur und der Ernährungsbedingungen können zu solchen Transformationen Anlaß geben. Es sei natürlich dahingestellt, ob diese Ergebnisse für die im experimentellen Teil dieser Arbeit beschriebenen Beobachtungen von Bedeutung sind.

Verschiedene Autoren beschäftigten sich mit dem Einfluß von γ -Globulin auf die Chloramphenicol- bzw. Ristocetinwirkung in vivo. Reedy und Mitarbeiter, Fisher, Holper und Mitarbeiter beschrieben eine deutlich additive Wirkung bei Verabreichung von Kombinationen dieser beiden Substanzgruppen. Diese im Tierexperiment erhobenen Befunde wurden klinisch bestätigt (Knouf, Waisbren).

Nach diesen mehrfach gemachten Beobachtungen lag die Frage nach dem Wirkungsmechanismus nahe. Am wahrscheinlichsten schien es, daß der zusätzliche therapeutische Effekt durch den Antikörpergehalt der γ -Globuline bedingt ist. Diese Vermutung ließ sich experimentell erhärten. Behandelte man das γ -Globulin vor der therapeutischen Anwendung mit dem der Infektion entsprechenden Antigen, dann blieb in Verbindung mit Chloramphenicol eine additive Wirkung aus (Reedy und Mitarbeiter, Fisher und Manning). Ferner beobachteten Manning, Gagliary und Fisher, daß γ -Globuline den antibakteriellen Chloramphenicoleffekt bei einer Infektion mit *Pasteurella multocida* nicht verstärken. Diese Beobachtung konnte damit erklärt werden, daß das humane γ -Globulin keine Antikörper gegen *Past. multocida* besitzt, weil dieser Keim nur für Tiere pathogen ist.

In der gleichen oder in einer ähnlichen Weise können Versuche mit Mäusen gedeutet werden, die mit Tuberkelbakterien infiziert worden waren. Die therapeutische Wirkung der bekannten Tuberkulostatika wurde auch in diesem Fall durch humanes γ -Globulin nicht verbessert (Manning, Gagliary und Fisher).

Nach diesen in der Literatur vielfältig beschriebenen Beobachtungen ist es durchaus berechtigt, unter quantitativen Gesichtspunkten die Frage nach einem Einfluß von Serumweiß bzw. von den entsprechenden Fraktionen auf die Generationszeit und das Resistenzbild von Staphylokokken zu untersuchen.

EIGENE VERSUCHE

3. MATERIAL UND METHODEN

a. Als Testkeime dienten:

1. *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 511 mit einer mittleren Pc-Sensibilität von 0,046 E Pc/ml.
2. Der aus pathologischem Material isolierte Penasebildende und deswegen Pc-resistente Stamm *M. pyogenes* var. *aureus* Re 1875 mit einer mittleren Pc-Sensibilität von 1875 E Pc/ml, sowie
3. einem nicht-penasebildenden, aber ebenfalls Pc-resistenten Stamm von *M. pyogenes* var. *aureus* Sg 40 mit einer mittleren Sensibilität zwischen 30 und 40 E Pc/ml.

Dieser letzte Stamm ist in seiner mittleren Pc-Resistenz nicht sehr konstant, so daß er verschiedentlich auf eine Änderung des Resistenzgrades untersucht wurde.

b. Resistenzprüfung im Dilutionstest

Die mittlere Pc-Resistenz bzw. Pc-Sensibilität wurde mit dem Dilutionstest ermittelt. Dabei wurde Pc in fallenden Konzentrationen und geometrischen Verdünnungsstufen eingefüllt. Die Impfdosis betrug nach mikroskopischer Einstellung 10^6 Zellen/ml unter Verwendung von Keimen aus einer jungen, 16 Stunden alten Bouillonkultur. Die Impfdosis spielt zwar gemeinhein in einer großen Breite keine Rolle, kann aber bei Verwendung von Penasebildnern aus begreiflichen Gründen von Bedeutung sein. Deswegen wurde zum besseren Vergleich in allen Fällen eine gleiche Impfdosis gewählt.

Die Ergebnisse wurden nach 18 Stunden Bebrütung bei 37°C abgelesen. Als mittlere Hemmkonzentration wurde die zwischen dem letzten unbewachsenen und dem ersten bewachsenen Röhrchen der Reihe liegende Pc-Konzentration errechnet. Zeigte das erste bewachsene Röhrchen nur ein ganz geringes Wachstum, dann wurde die darin enthaltene Pc-Konzentration als Grenzwert angegeben.

Wurde die Pc-Resistenz in Anwesenheit von Serum bestimmt, dann wurde ein Teil der Bouillon durch Serum ersetzt, so daß der Anteil von Serum im Reaktionsgemisch in einer Reihe stets konstant war. Ferner wurde die Pc-Lösung in Aqua dest. vorverdünnt und dann in stets gleichen Volumina den einzelnen Röhrchen einer Reihe zugegeben.

Als Serum wurde bei den Verdünnungstesten nur aktives und durch 1/2 Stunde Erhitzen auf 56°C inaktiviertes Hammelserum (= Has) benutzt.

Jedes Röhrchen einer Reihe enthält also 0,5 ml Serum der gewünschten Konzentration (Vorverdünnung des Serums in Bouillon), 0,5 ml einer wäßrigen Pc-Lösung und 1 ml einer Bouillon, enthaltend die Testkeime. Bei den später gemachten Angaben über die Konzentrationsverhältnisse handelt es sich stets um die Endkonzentrationen, also auch bei der Impfdosis.

c. Gewinnung von Serum und seinen Fraktionen

Benutzt wurden Humanserum (= Hus) und Has. Nach einer Aufbewahrung von 24 Stunden im Eisschrank wurden der Blutkuchen und die Ery abzentrifugiert. Es sei erwähnt, daß das Has trotz wiederholter Versuche nicht immer ganz hämolysefrei erhalten werden konnte.

Eine Baktericidie wurde durch einen Plattenversuch ausgeschlossen. Dieser wurde in Anlehnung an die Angaben von Kriegel und Spode durchgeführt.

Dazu wurde eine junge, 16 Stunden alte Bouillonkultur von *M. pyog. var. aureus* Sg 511 nach Verdünnung auf 10^{-4} mit physiologischer NaCl-Lösung zu gleichen Volumina des zu testenden Serums versetzt. Davon wurden unmittelbar nach Herstellung des Ansatzes und einer Vorverdünnung auf 10^{-3} mit Bouillon je 0,3 ml auf 7 Agarplatten gegeben und bis zum nächsten Tag bebrütet. Dasselbe wurde nach einer 4 Stunden langen Inkubation bei 37°C wiederholt. Eine Abnahme der ursprünglichen Koloniezahl entspräche einem bakteriziden Serumeffekt.

Die gewonnenen Serumproben wurden durch ein Asbestfilter keimfrei filtriert und dann im Eisschrank aufbewahrt.

Gewinnung von Albuminen und γ -Globulinen

Nach den Versuchen von Tiselius und Svenson fällt der größte Teil der γ -Globuline in einem engen Bereich unterhalb einer 30%igen Sättigung mit Ammoniumsulfat aus. Die α - und β -Globuline beginnen bei ca. 30%

Sättigung auszufallen und sind bei einer Sättigung von 60% noch in geringen Mengen in Lösung; wahrscheinlich in Form des Glycoglobulins bzw. des Globoglycoids von Hewitt (= ein Anteil des Pseudoglobulins). Da die kohlenhydrathaltigen Anteile etwas löslicher sind als die freien Albumine, lassen sie sich durch häufiges Umkristallisieren entfernen und in den Mutterlaugen anreichern. Schultze hat eine genügende Reinheit erst nach neunmaligem Ausfällen erreicht. Voraussetzung für den Ausfall der Globuline ist, daß kein Hämoglobin in größeren Mengen im Serum enthalten ist, da sich die Globuline sonst wie Albumine verhalten, d.h. bei Halbsättigung mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ in Lösung bleiben (H. Schmidt).

Die von uns für die Herstellung der Albumin- und Globulin-Fractionen verwendeten Serumproben waren völlig hämoglobinfrei. Für unsere Versuche wurden die Seren vom Hammel und vom Menschen benutzt.

Die Ausfällung der γ -Globuline wurde durch eine 27,5%ige Sättigung mit Ammoniumsulfat erzielt, da bei einer 30%igen Sättigung auch schon die α - und β -Globuline auszufallen beginnen. Die ausgefallenen γ -Globuline wurden durch Zentrifugieren in der Kühlzentrifuge gewonnen und das Produkt aus 40 ml Serum mit 10 ml phys. NaCl-Lösung wieder aufgenommen. Nach Entfernung der α - und β -Globuline durch Erhöhung der $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung wurden Albumine durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zur Sättigung gewonnen. Die wieder in Lösung gebrachten γ -Globuline und Albumine werden 18 Stunden gegen phys. NaCl-Lösung dialysiert und dann auf die ursprüngliche Serummenge = 40 ml aufgefüllt.

Die Reinheit der Fractionen wurde papierelektrophoretisch kontrolliert. Dazu bedienen wir uns des Elektrophoreseapparates ELPHOR von Bender und Hobein, Karlsruhe-München-Zürich. Von dem verwendeten Serum und seinen Fractionen werden jeweils 0,007 ml auf einen mit Veronalpuffer (pH 7,9 - 8,6) angefeuchteten Filterstreifen aufgetragen. Die Streifen werden so über einen Steg gespannt, daß die Enden in den Veronalpuffer der Elphokammern tauchen. An die eine Seite wird die Kathode, an die andere Seite die Anode angeschlossen und ein Gleichstrom von 110 Volt angeschaltet.

Nachdem der Streifen dem elektrischen Feld 15 Stunden ausgesetzt war, wird er 10 min. mit Amidoschwarz (Grassmann und Hannig) angefärbt und dann im Acetessigsäure-Methanolgemisch (1:10) entfärbt, d.h. die nicht an einen Serumanteil gebundene überschüssige Farbe wird entfernt. Nachdem der Filterstreifen trocken und dann transparent gemacht ist, wird er am Spalt eines Spezialcolorimeters (Zeiss) vorbeigeführt, so daß die Extinktion des

Streifens in Abhängigkeit von der Wanderungstrecke der Plasmateilchen vermessen werden kann. In dem entstandenen Diagramm werden die den Fraktionen entsprechenden Ausschläge des Extinktionsschreibers als Gauß'sche Kurven ausgezeichnet und diese Flächen planimetrisch erfaßt. Die Planimeterwerte addiert werden gleich 100% gesetzt; die der ausgefallten Fraktionen werden auf die des Serums bezogen.

Serumnormalwerte (nach Antweiler):

	<u>Mensch</u>	<u>Hammel</u>
Albumine	55 - 64%	57,3 %
α_1 -Globuline	3 - 4%	
α_2 -Globuline	6 - 9%	10,5 %
β -Globuline	9 - 15%	7,2 %
γ -Globuline	11 - 18%	25,0 %

Nach Edsall sind Schwankungen in der Zusammensetzung des Serumweißbildes bei Tieren charakteristisch.

d. Aufstellung von Wachstumskurven

Wachstumskurven der verwendeten Testkeime wurden mit der sog. Lebendkeimzahlbestimmung angelegt. Dabei bewertet man nicht die Zahl der einzelnen Bakterienzellen pro ml, sondern die nach Vorverdünnung im Ausstrich auf Agar gefundene Kolonie-Zahl unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors. Dabei wurde im einzelnen untersucht, ob die Anwesenheit von Serum einen Einfluß auf die Wachstumskurven hat. Bei den Versuchen mit dem Pc-sensiblen Stamm Sg 511 wurde unterschieden zwischen dem Wachstum der Gesamtpopulation, d.h. praktisch dem Wachstum des größeren sensiblen Anteils, und dem wesentlich kleineren resistenten Anteil der Gesamtpopulation. Die resistenten Varianten wurden in der Weise erfaßt, daß stets gleiche Volumina des Ansatzes auf Pc-haltige Agarnährböden gegeben wurden. Dadurch kam nur der resistentere Anteil der Population zur Entwicklung. Als Pc-Konzentration des Agars wurde die mittlere Hemmkonzentration des Stammes ($= 0,046 \text{ E Pc/ml}$) gewählt. Die Abimpfungen des Ansatzes erfolgten nach 0 - 1/2 - 1 - 1 1/2 - 2 - 3 - 4 - 5 Stunden Bebrütung bei 37°C. Für die Gesamtkeimzahlbestimmung (Koloniezahl) wurde eine Vorverdünnung von 1 : 30 000 und für die 3 - 4 - 5 - Stundenwerte eine

solche von 1 : 500 000 gewählt. Die Einsaatdosis betrug nach mikroskopischer Einstellung 10^6 Keime/ml aus einer jungen, 16 Stunden alten Bouillonkultur. Für die Gesamtkeimzahlbestimmung wurden je 0,3 ml auf jede Platte aufgegeben und bei der Bestimmung des resistenten Anteils je 0,5 ml ohne Vorverdünnung. Die Serumendkonzentration im Ansatz betrug 1 : 5, 1 : 10, 1 : 25.

Diese Versuche wurden nur mit dem Pc-sensiblen Stamm durchgeführt, da der größte Anteil der resistenten Stämme ohnehin aus resistenten Varianten besteht.

e. Berechnung der Generationszeit

Die Berechnung der Generationszeit (= Gen. Zeit) erfolgte nach der auf den Untersuchungen von Hinshelwood beruhenden Berechnung von Squires und Hartsell. Die hier verwendete Formel lautet:

$$G = \frac{\Delta t}{k (\log B - \log A)}$$

Dabei ist: G = Gen-Zeit in Stunden
 t = $t_2 - t_1$
 B = Keimzahl pro ml zum Zeitpunkt von t_2
 A = Keimzahl pro ml zum Zeitpunkt von t_1
 k = Konstante mit dem Wert 3,32

Zu bemerken ist, daß t_1 und t_2 im Bereich der log. Wachstumsphase liegen. Gemeinhin wird die in Stunden errechnete Gen. Zeit dann in Minuten angegeben.

f. Bestimmung des O_2 -Verbrauchs

Mit Hilfe einer Warburgapparatur wurde Stoffwechselleistung der Testkeime, gemessen am O_2 -Verbrauch, bestimmt. Die Messungen erfolgten bei einer Versuchstemperatur von $37^\circ C$. Im Stutzen der Kölbchen befand sich das Pc, welches nach deutlichem Ansteigen der Stoffwechselkurve zugekippt wurde. Die Pc-Endkonzentration entsprach stets der 3-fachen Hemmkonzentration, welche im Dilutionstest ermittelt worden war.

Die Versuche wurden mit Hus und Has sowie mit der Albumin- und γ -Globulinfraktion dieser Seren durchgeführt.

Als Testkeime dienten die 3 genannten Stämme, nachdem sie aus einer jun-

gen, 16 Stunden alten Bouillonkultur abzentrifugiert und gewaschen worden waren. Die Einstellung der Keimkonzentration erfolgte nach mikroskopischer Keimzählung.

Das Schema der Versuchsanordnung ist in Tab.1 wiedergegeben.

Tab.1: Anordnung der Warburgversuche

Mengen			Endkonzentration	Anfangskonzentration
Serum	1	ml	1 : 5	1 : 2
Keimbouillon	1	ml	10^8 K/ml	$2,5 \times 10^8$ K/ml
Pc-Lösung	0,5	ml	3 fache HK	5 fache Endkonzentr.
Serum	1	ml	1 : 10	1 : 4
Keimbouillon	1	ml	10^8 K/ml	$2,5 \times 10^8$ K/ml
Pc-Lösung	0,5	ml	3 fache HK	5 fache Endkonz.
Serum	1	ml	1 : 25	1 : 10
Keimbouillon	1	ml	10^8 K/ml	$2,5 \times 10^8$ K/ml
Pc-Lösung	0,5	ml	3 fache HK	5 fache Endkonz.

Zeichenerklärung: K = Keime
HK = Hemmkonzentration

Nur die Versuche mit Sg 40 wurden mit einer höheren Keimkonzentration ($= 4 \times 10^8$ K/ml Endkonzentration) durchgeführt. Dies war erforderlich, da die Stoffwechselleistung dieses Stammes nicht sehr ausgeprägt ist.

Flüssigkeitsvolumen im Kölbchen beträgt 2,0 ml und im Stutzen 0,5 ml; Volumen der 32%igen NaOH 0,2 ml.

4. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

a. Die Ergebnisse der Dilutionsteste

sind in den Tab. 2 a-c wiedergegeben. Dabei wurden die drei Teststämme von *M. pyog. var. aur.* gegen Pc in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen aktiven und inaktiven Has ausgetestet.

Tab. 2 a-c: Die Änderung der Pc-Sensibilität (Bakteriostase) von Staph. aureus-Stämmen in Gegenwart von aktivem und inaktivem Hammelserum

2 a. Testkeim: M. pyog. var. aureus Sg 511

Ansatz Serum- endverdünnung	Pc-Konzentrat. in E Pc/ml					mittl. Pc-Sens. in E Pc/ml
	0,125	0,06	0,03	0,015	0,007	
1:5 a	-	-	+	+	++	0,046
1:5 ia	-	-	+	+	++	0,046
1:10 a	-	-	+	+	++	0,046
1:10 ia	-	-	-	+	+	0,023
1:20 a	-	-	-	+	++	0,023
1:20 ia	-	-	-	+	++	0,023
1:50 a	-	-	-	+	++	0,023
1:50 ia	-	-	-	+	+	0,023
Bouillonkontrolle	-	-	+	+	+	0,046

Zeichenerklärung zu den Tab. 2 a-c: a = aktives Serum
ia = inaktives Serum

2 b. Testkeim: M. pyog. var. aureus Sg 40 (nicht-Penasebildner)

Ansatz-Serum endverdünnung	Pc-Konzentrat. in E Pc/ml					mittl. Pc-Sens. in E Pc/ml
	100	50	25	12,5	6,25	
1:5 a	-	-	+	+	+	37,5
1:5 ia	-	-	+	+	+	37,5
1:10 a	-	-	+	+	+	37,5
1:10 ia	-	-	+	+	+	37,5
1:20 a	-	-	+	+	++	37,5
1:20 ia	-	-	+	+	+	37,5
1:50 a	-	-	-	-	+	9,35
1:50 ia	-	-	-	-	+	9,35
Bouillonkontrolle	-	-	-	-	+	9,35

2 c. Testkeim: *M. pyog. var. aureus* Re 1875 (Penasebildner)

Ansatz-Serum- endverdünnung	Pc-Konzentrat. in E Pc/ml					mittl. Pc-Sens. in E Pc/ml
	125	62,5	31,25	15,62	7,81	
1 : 5 a	-	-	-	+	++	23,4
1 : 5 ia	-	-	-	+	++	23,4
1 : 10 a	-	-	-	+	++	23,4
1 : 10 ia	-	-	-	+	++	23,4
1 : 20 a	-	-	-	+	+++	23,4
1 : 20 ia	-	-	+	+	++	46,8
1 : 50 a	-	-	-	+	++	23,4
1 : 50 ia	-	-	-	+	+++	23,4
Bouillonkontrolle	-	-	-	+	++	23,4

Aus den Tabellen 2 a-c ist zu entnehmen, daß ein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Serum nicht besteht.

Der Versuch mit Sg 511 erweckt den Eindruck, als würden höhere Serumverdünnungen den Pc-Effekt im Gegensatz zu den höheren Serumkonzentrationen etwas verbessern. Denselben Eindruck gewinnt man bei der Anwendung des Pc-resistenten nicht-penasebildenden Stammes, nicht aber bei dem Penasebildner. Es muß dabei allerdings gesagt werden, daß eine sichere Aussage nicht möglich ist, da erfahrungsgemäß beim Dilutionstest eine Verdünnungsstufe als normale Streubreite angesehen werden muß, wenn auch die gemachte Beobachtung bei einer Reihe von kontinuierlich zunehmenden Verdünnungsgraden ziemlich konstant auftritt. Auf diese Beobachtung soll deswegen in Verbindung mit den später zu beschreibenden Versuchen zurückgegriffen werden.

Vermerkt sei noch, daß es in Gegenwart von Serum schlechthin zu einer Verklumpung der Staphylokokken kam.

Da das Ergebnis mit Has nicht sehr eindeutig war, wurde zunächst auf die Verwendung von Hus verzichtet.

b. Aufstellung von Wachstumskurven durch Lebendkeimzahlbestimmung

aa. Die Ergebnisse der Versuche mit verschiedenen Endverdünnungen von aktivem und inaktivem Hammelserum und Sg 511 als Teststamm sind in Tab.3 und 4 wiedergegeben. Aus diesen Zahlen ergeben sich die in Abb.1 und 2 dargestellten Wachstumskurven.

Tab.3: Wachstumskurven von Sg 511 in Abhängigkeit von Zeit und Serumkonzentration

aktives Hammelserum

Serum- konz.	Nähr- boden	Zeit in Stunden								
		0	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	
Kon- trolle	Agar	0,17	0,17	0,15	0,30	0,78	7,7	26,8	75,8	$\times 10^7$ K/ml
	Pc-Ag.	3,2	3,0	2,8	1,2	1,4	1,2	2,8	2,6	K/ml
1 : 5	Agar	0,15	0,11	0,16	0,14	0,14	0,78	1,0	1,6	$\times 10^7$ K/ml
1 : 5	Pc-Ag.	6,0	3,2	5,0	3,6	2,2	3,6	4,0	2,0	K/ml
1 : 10	Agar	0,16	0,12	0,19	0,16	0,19	1,0	1,9	1,6	$\times 10^7$ K/ml
1 : 10	Pc-Ag.	3,6	3,4	2,8	3,0	4,6	3,0	2,0	1,8	K/ml
1 : 25	Agar	0,17	0,13	0,12	0,18	0,19	1,2	1,6	5,3	$\times 10^7$ K/ml
1 : 25	Pc-Ag.	4,6	2,2	0,8	3,6	3,2	2,2	1,6	1,4	K/ml

Tab.4: inaktives Hammelserum

Serum- konz.	Nähr- boden	Zeit in Stunden								
		0	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	
Kon- trolle	Agar	0,17	0,17	0,15	0,30	0,78	7,7	26,8	75,8	$\times 10^7$ K/ml
	Pc-Ag.	3,2	3,0	2,8	1,2	1,4	1,2	2,8	2,6	K/ml
1 : 5	Agar	0,24	0,19	0,17	0,14	0,15	0,76	0,93	0,53	$\times 10^7$ K/ml
1 : 5	Pc-Ag.	5,6	3,6	3,2	3,4	1,6	0,8	2,6	1,0	K/ml
1 : 10	Agar	0,19	0,18	0,18	0,14	0,13	1,6	1,0	1,2	$\times 10^7$ K/ml
1 : 10	Pc-Ag.	5,8	3,8	3,6	2,2	4,2	2,8	1,4	0,4	K/ml
1 : 25	Agar	0,26	0,23	0,18	0,15	0,20	1,6	2,2	6,5	$\times 10^7$ K/ml
1 : 25	Pc-Ag.	2,4	2,2	2,2	2,4	1,4	2,0	3,2	2,0	K/ml

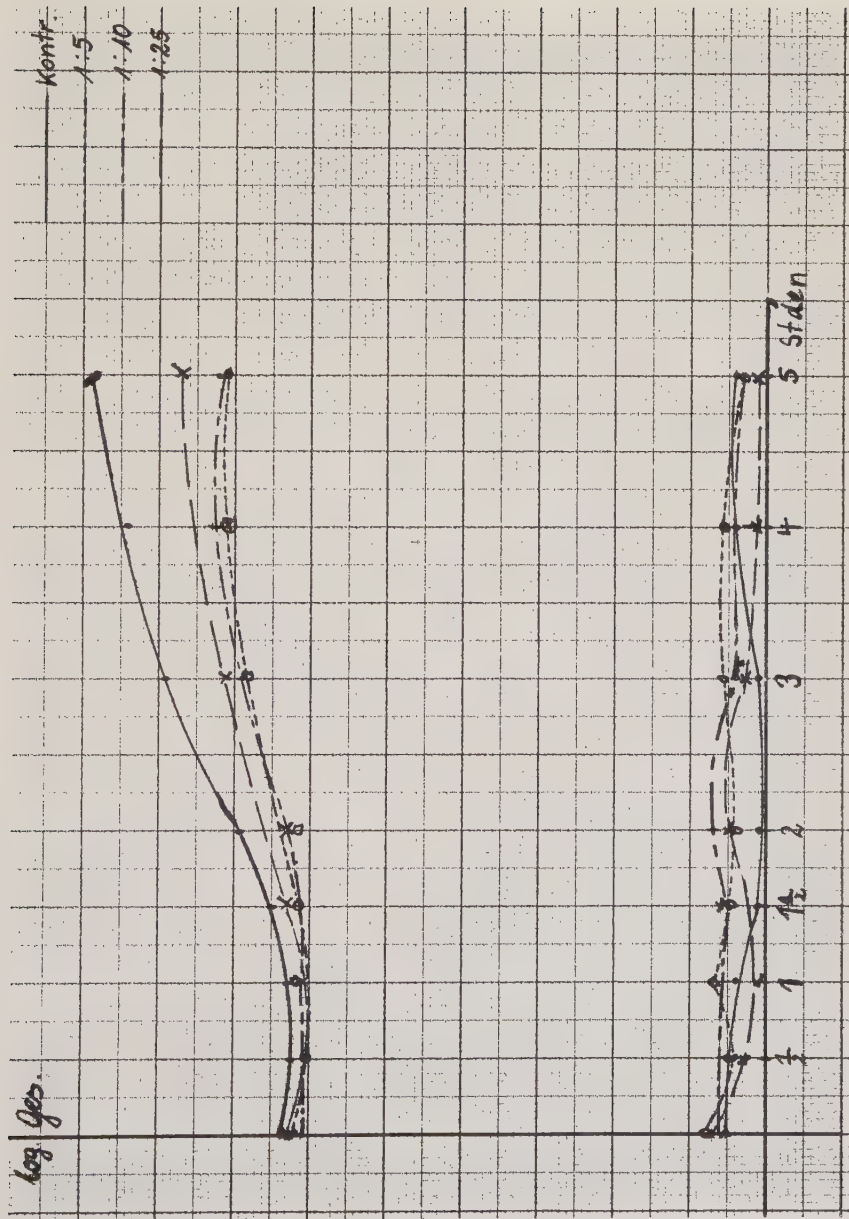


Abb. 1

log 9.5.

Kontur:
1:5
1:10
1:25

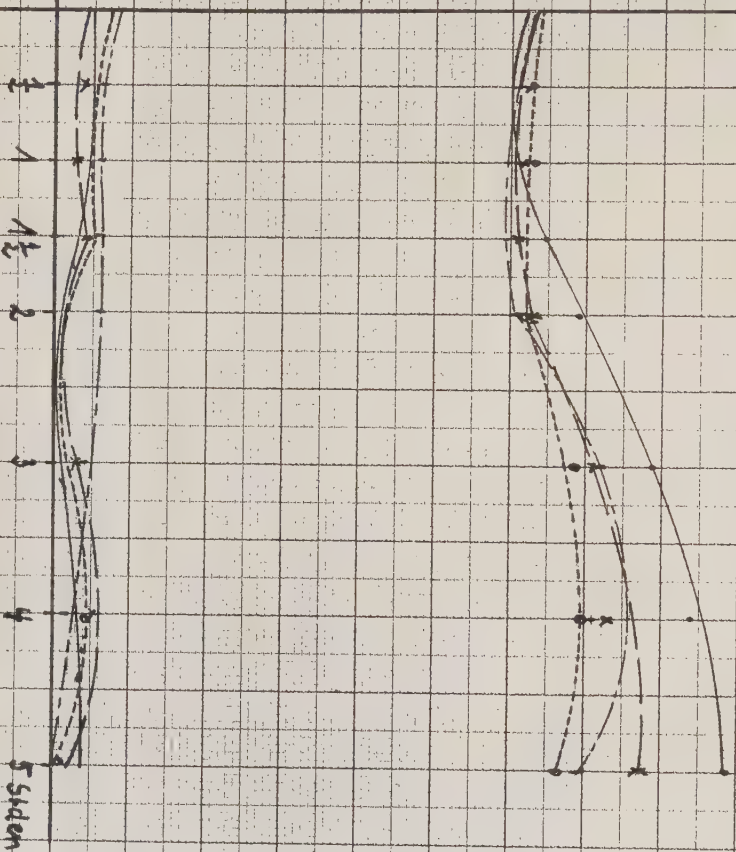


Abb. 2

Aus Tab.3 und 4 bzw. Abb.1 und 2 ist zu erkennen, daß bei dem gewählten Resistenzkriterium (Pc-Konzentration der Agarplatten) eine nennenswerte Veränderung der Anzahl resistenter Varianten nicht auftrat. Die sensiblen Zellen, d.h. praktisch die Gesamtheit der Population des Pc-sensiblen Stammes Sg 511, werden aber durch aktives Has in ihrer Vermehrungsgeschwindigkeit gehemmt. Dabei ist auffallend, daß dieser Effekt bei der geringeren Serumverdünnung, also bei der höheren Serumkonzentration, ausgeprägter ist.

Bei Verwendung von inaktivem Serum ist die Hemmung der Vermehrungsgeschwindigkeit bei allen drei Serumverdünnungen von 1:5 bis 1:25 vergleichbar ausgeprägt.

bb. Die Beeinflussung der Wachstumskurve desselben Pc-sensiblen Stammes Sg 511 durch Humanserum ist in Tab. 5 und 6 bzw. in Abb.3 und 4 wiedergegeben. Zu diesem Versuch ist zu vermerken, daß hier ebenfalls die Entwicklung der Keimkonzentration unter Verwendung von Pc-haltigem Agar für die Koloniezählung benutzt wurde. Allerdings wurde hierbei nicht wie bei der vorhergehenden Versuchsreihe eine Pc-Konzentration von 0,05 e Pc/ml, sondern eine solche von nur 0,04 E Pc/ml gewählt. Das Kriterium für die Chemosensibilität der resistenten Varianten der Population lag also niedriger.

Tab. 5 und 6: Wachstumskurven von Sg 511 in Abhängigkeit von Zeit und Serumkonzentration

aktives Humanserum

Serum- konz.	Nähr- boden	Zeit in Stunden								
		0	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	
Kon- trolle	Agar	0,09	0,10	0,13	0,11	0,34	2,5	13,3	29,4 x 10 ⁷	K/ml
	Pc-Ag.	6,4	4,6	6,8	9,8	15,4	27,2	88,2	279,4	K/ml
1 : 5	Agar	0,27	0,20	0,15	0,19	0,17	1,9	11,3	10,2 x 10 ⁷	K/ml
1 : 5	Pc-Ag.	12,0	15,8	98,0	33,0	34,4	62,4	101,0	sehr viele	K/ml
1 : 10	Agar	0,11	0,11	0,11	0,11	0,10	1,7	5,7	21,7 x 10 ⁷	K/ml
1 : 10	Pc-Ag.	5,2	3,0	4,8	4,8	6,2	20,4	80,8	152,6	K/ml
1 : 25	Agar	0,19	0,19	0,20	0,14	0,10	3,1	4,5	12,0 x 10 ⁷	K/ml
1 : 25	Pc-Ag.	5,8	5,2	9,0	10,0	11,6	16,6	34,8	96,4	K/ml

inaktives Humanserum

Serum- konz.	Nähr- boden	Zeit in Stunden								
		0	1/2	1	1 1/2	2	3	4	5	
Kon- trolle	Agar Pc-Ag.	wie oben								
1 : 5	Agar	0,12	0,11	0,09	0,07	0,07	0,75	1,8	5,9	10^7 K/ml
1 : 5	Pc-Ag.	2,2	2,6	2,6	2,0	1,6	3,0	6,4	36,8	K/ml
1 : 10	Agar	0,26	0,20	0,18	0,18	0,20	1,46	4,3	19,6	10^7 K/ml
1 : 10	Pc-Ag.	15,6	12,8	16,8	16,8	18,4	45,4	61,4	97,0	K/ml
1 : 25	Agar	0,18	0,14	0,17	0,16	0,10	1,1	2,6	23,0	10^7 K/ml
1 : 25	Pc-Ag.	9,2	9,2	11,8	15,4	13,0	29,4	115,2	28,20	K/ml

Aus den Tab. 5 und 6 und den Abb. 3 und 4 ist zu entnehmen, daß aktives und inaktives Hus zwar auch einen Einfluß auf die Wachstumsgeschwindigkeit hat, jedoch ist dieser wesentlich geringer als bei Verwendung von Has. Ein Unterschied zwischen aktivem und inaktivem Hus ist dagegen nicht zu erkennen.

Bei der in diesem Versuch als Kriterium für die Pc-Resistenz gewählten niedrigen Pc-Konzentration im Agar läßt sich eine Zunahme der resistenten Zellen beobachten. Die Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit durch Serum ist aber nicht deutlich. Nur bei Verwendung von Hus 1 : 5, d.h. also der höchsten Serumkonzentration (inakt. Serum) läßt sich ein gewisser Unterschied erkennen. Dabei handelt es sich im Rahmen der gesamten Versuchsreihe um eine Ausnahme, die deswegen schwer als bezeichnend angesehen werden kann.

Als besondere Beobachtung sei vermerkt, daß sich bei diesem Versuch mit Hus die Testbouillon homogen trübt, während bei Verwendung von Has es zu einer Zusammenballung der Zellen kam. Damit stimmt diese Beobachtung mit der früher schon getroffenen überein.

d. Bestimmung der Generationszeit

Die Ergebnisse aus der Berechnung der Gen. Zeiten bei verschiedenen Versuchsbedingungen mit Sg 511 als Testkeim sind in Tab. 7 wiedergegeben.

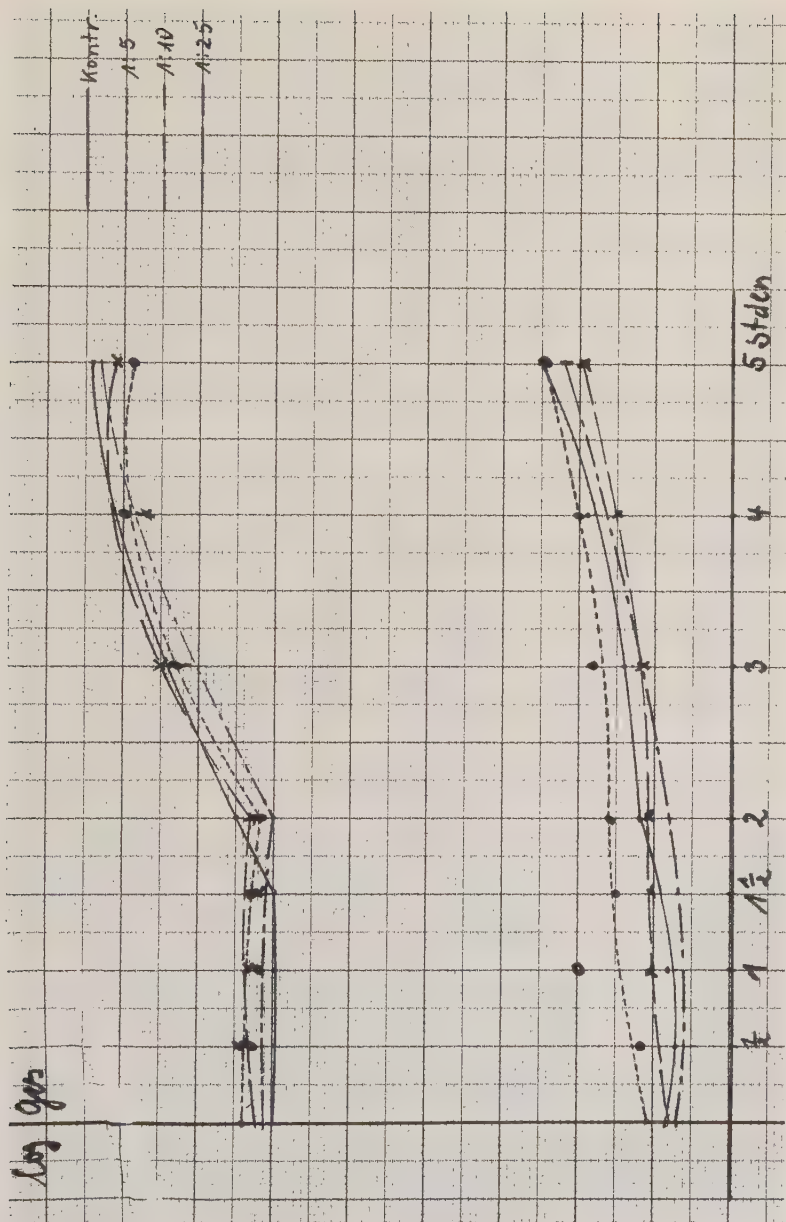


Abb. 3

log q₂

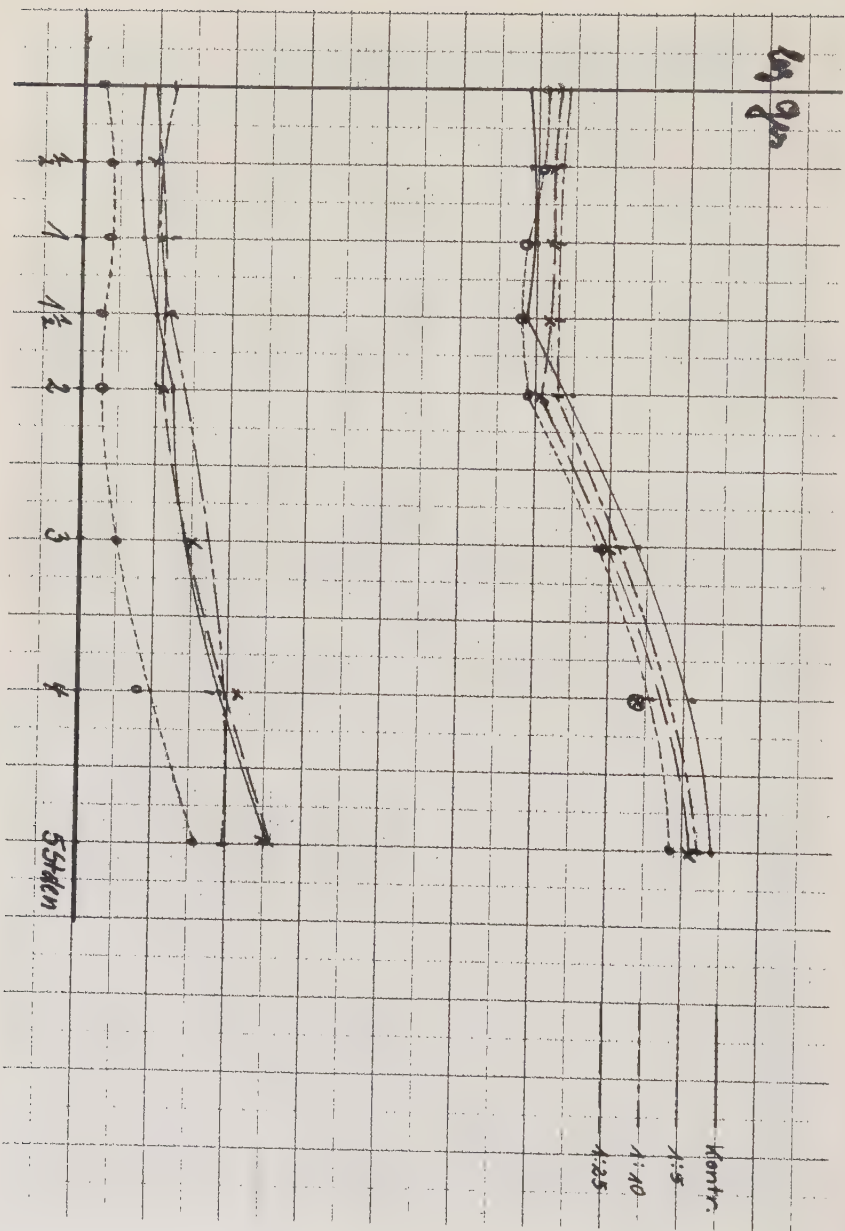


Abb. 4

Für die Berechnung der Gen. Zeiten werden die Keimzahlen (Koloniezahlen) pro ml Testsuspension zu Beginn und zum Ende der log. Wachstumsphase herangezogen.

Aus Tab. 7 ist zu entnehmen, daß mit nicht-inaktiviertem Has eine deutliche Verlängerung der Gen. Zeit, d.h. eine Verlangsamung der Vermehrungsgeschwindigkeit eintritt. Diese Erscheinung ist am deutlichsten bei der höchsten Serumkonzentration. Bei der mittleren Serumverdünnung dürfte es sich beim 3. Wert höchstwahrscheinlich um einen Meßfehler handeln, wenn auch bei demselben Verdünnungsgrad und inaktiviertem Has ein ähnlicher Kurvenverlauf zu beobachten war.

Die bei der Verwendung von inaktiviertem Has beobachteten Gen. Zeiten sind fast völlig gleich denen mit aktivem Has.

Wurde der Effekt von aktivem Hus untersucht, dann nimmt die Gen. Zeit erstaunlicherweise mit zunehmendem Verdünnungsgrad zu; so als wäre ein Hemmstoff vorhanden, der durch die Verdünnung mehr und mehr in Wegfall kommt; nimmt man dagegen inaktiviertes Hus, dann liegen die Werte etwa im Bereich der Norm.

Tabelle 7: Berechnung der Gen. Zeiten von Sg 511
(sens. Anteil d. Population)

Serum	Endverdünnung	$t_2 - t_1$ in Std.	Gen. Zeit in Min.
Has aktiv	1 : 5	5 - 2	52,1
	1 : 10	3 - 2	17,4
	1 : 25	5 - 2	39,0
Has inaktiv	1 : 5	4 - 2	52,4
	1 : 10	3 - 2 1/4	14,9
	1 : 25	5 - 2	36,1
Hus aktiv	1 : 5	4 - 2 1/4	19,5
	1 : 10	5 - 2 1/4	23,7
	1 : 25	5 - 2	30,1
Hus inaktiv	1 : 5	5 - 2	28,4
	1 : 10	5 - 2	27,2
	1 : 25	5 - 2 1/4	24,7
1. Bouillonkontr.		5 - 1 1/4	25,1
2. Bouillonkontr.		5 - 1 3/4	26,5

d. Bestimmung des O₂-Verbrauchs

Diese Versuche wurden mit allen drei Teststämmen durchgeführt.

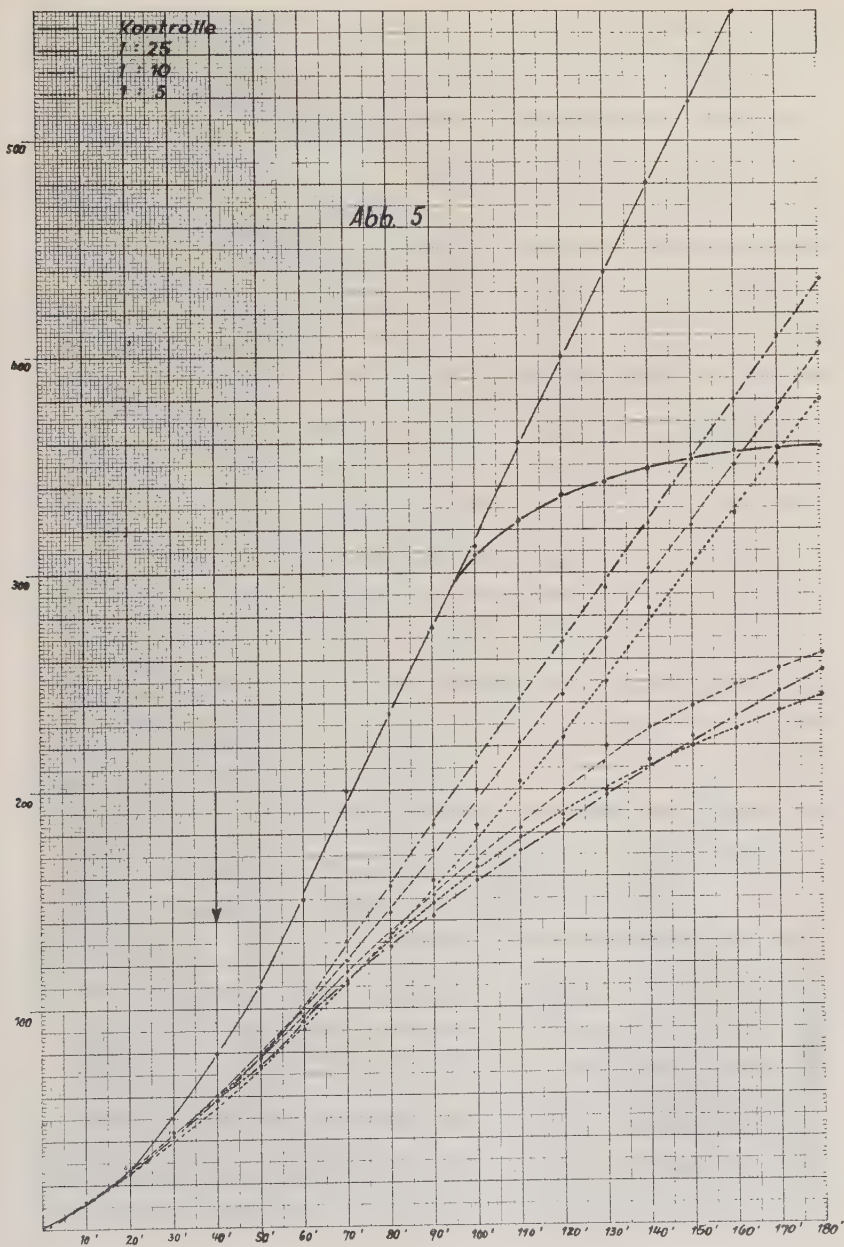
Versuch 1: In diesem Versuch wurde der Einfluß von aktivem Ham-
mels serum in verschiedenen Konzentrationen, in Abwesenheit und in An-
wesenheit von Pc (Endkonz. = 0,7 E Pc/ml) auf den O₂-Verbrauch von
Sg 511 (Endkonz. = 10⁸ K/ml) untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 5
wiedergegeben. Aus Abb. 5 geht hervor, daß das aktive Has den O₂-Ver-
brauch in Abhängigkeit von der Serumkonzentration hemmt. Dieses Ergebnis
entspricht durchaus den Wachstumskurven unter entsprechenden Bedingungen
bzw. den berechneten Gen. Zeiten.

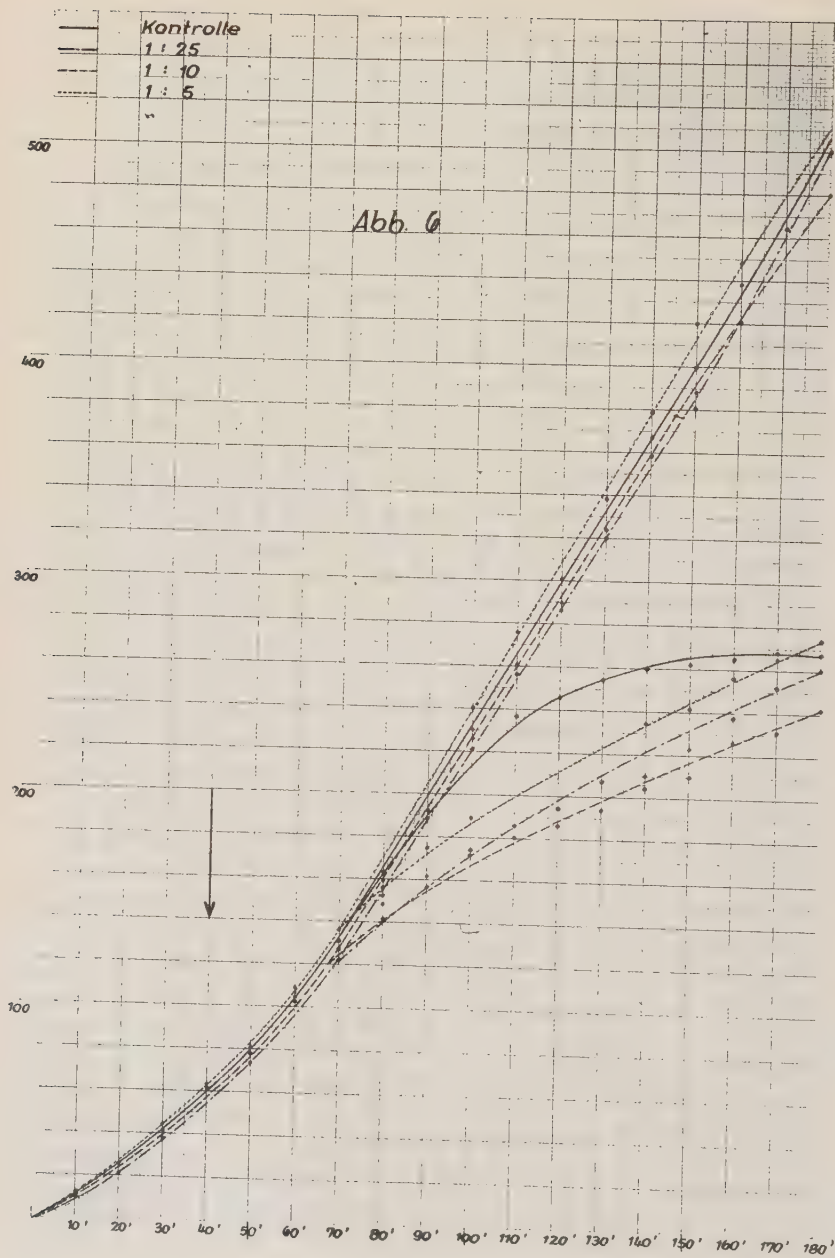
In Gegenwart von Pc wird durch Serum der O₂-Verbrauch ebenfalls gehemmt,
jedoch ist eine Abhängigkeit von der Serumkonzentration weniger deutlich.
Bei Betrachtung des Wertes während einer Versuchsdauer von 180 Min. scheint
der Serumeffekt ohne Pc relativ größer zu sein als mit Pc. Ebenso scheint der
Pc-Effekt verglichen mit der Kontrolle ohne Pc. in Abwesenheit von Serum
ausgeprägter zu sein.

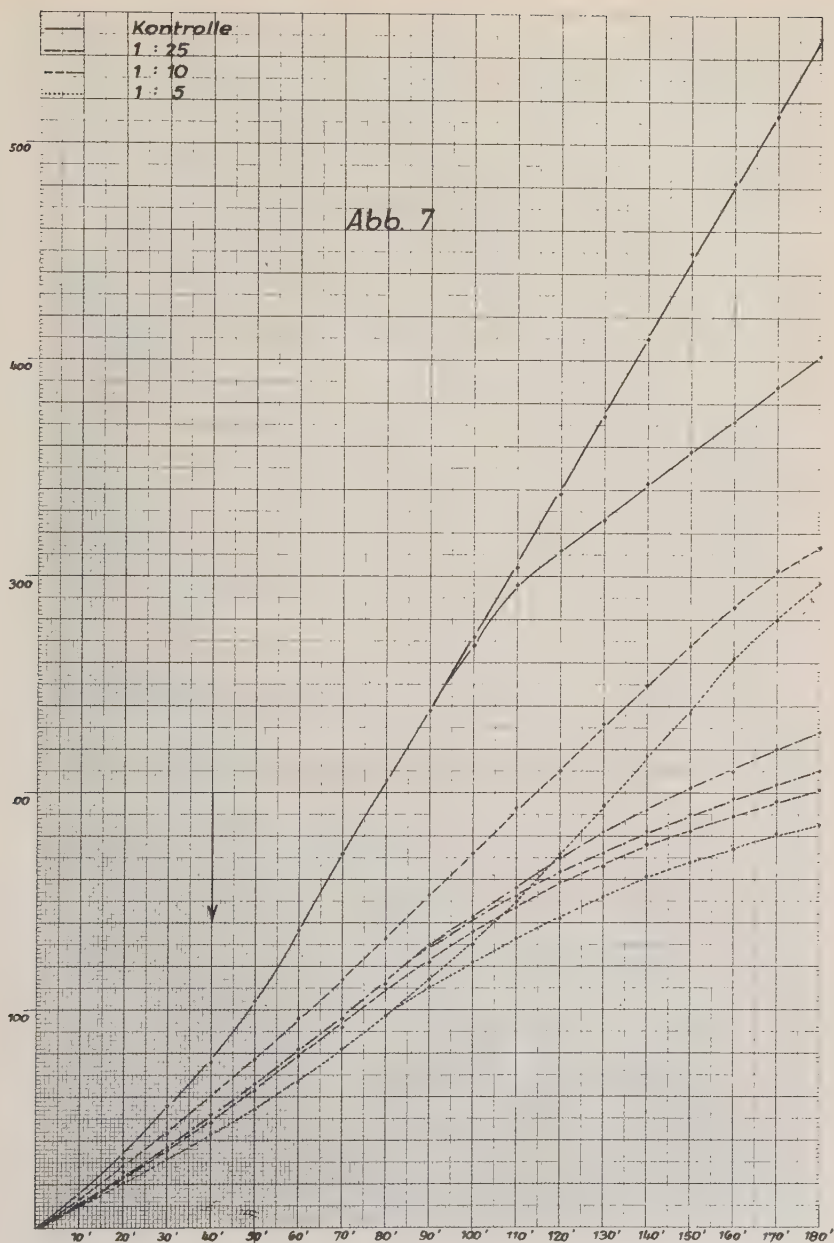
Versuch 2: Dieser Versuch entspricht dem Versuch 1, jedoch mit der Aus-
nahme, daß inaktiviertes Has benutzt wurde. Die Ergebnisse sind in
Abb. 6 wiedergegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß das inaktivierte Has
den O₂-Verbrauch praktisch nicht beeinflusst. Dieses Resultat kann schwer
mit der Bestimmung der Gen. Zeiten in Einklang gebracht werden. Auch be-
einflußt das Serum den O₂-Verbrauch in Gegenwart von Pc, verglichen mit
der entsprechenden Kontrolle, wenig.

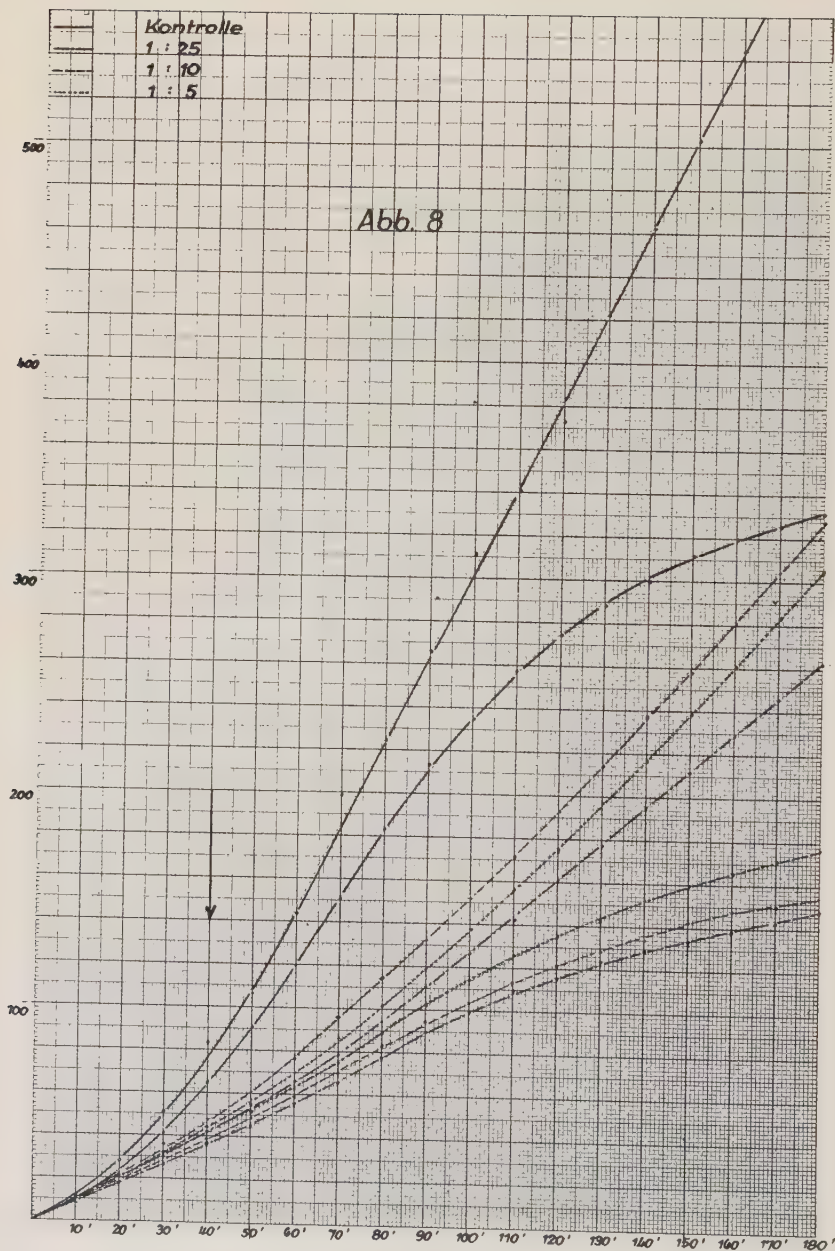
Versuch 3: Bei diesem Versuch diente *M. pyog. var. aureus* Re
1875 (Penasebildner) als Testkeim (Keimendkonz. = 10⁸ K/ml, Pc-End-
konz. = 28125 E Pc/ml). Als Serum wurde aktives Has benutzt. Der
Versuch wurde zweimal ausgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 7 und 8
wiedergegeben. Aus den Abbildungen ist zu entnehmen, daß das aktive Has
den O₂-Verbrauch des Teststammes hemmt. Auffallend ist, daß die höchste
Serumverdünnung den deutlichsten Effekt hat. Beide Versuche stimmen dar-
in überein. Die beiden höheren Konzentrationen verhalten sich nicht sehr
unterschiedlich zueinander.

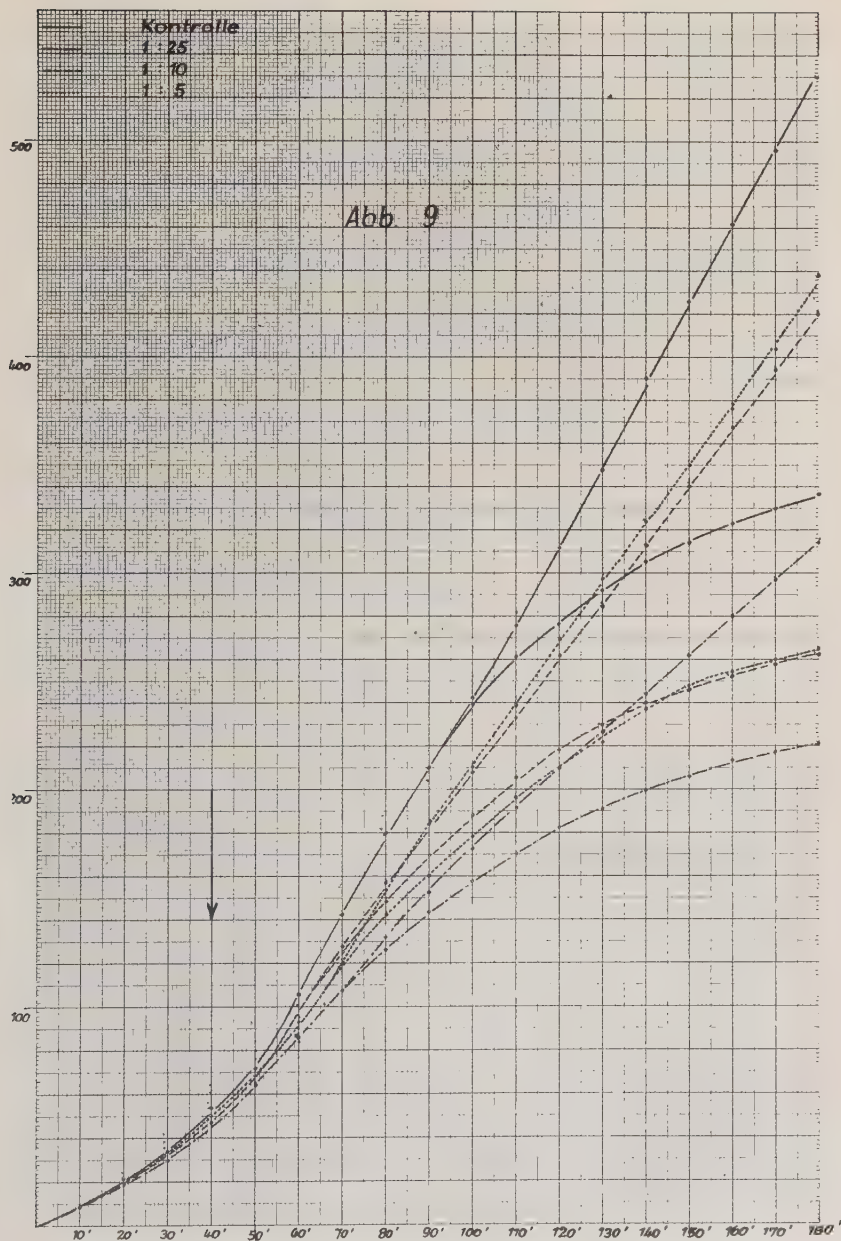
In Gegenwart von Pc kommt der Serumeffekt zusätzlich zum Ausdruck, je-
doch ist der Unterschied zwischen den einzelnen Serumkonzentrationen nicht
sehr groß.

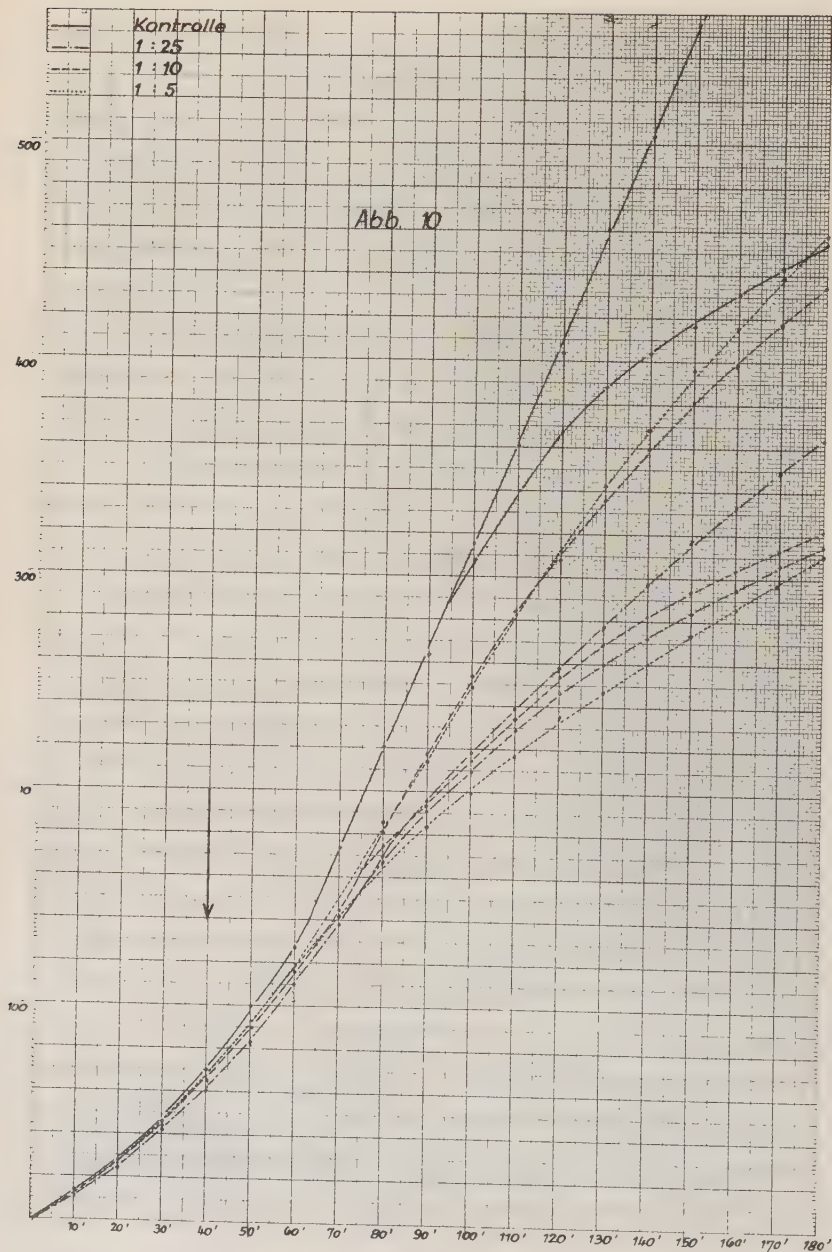






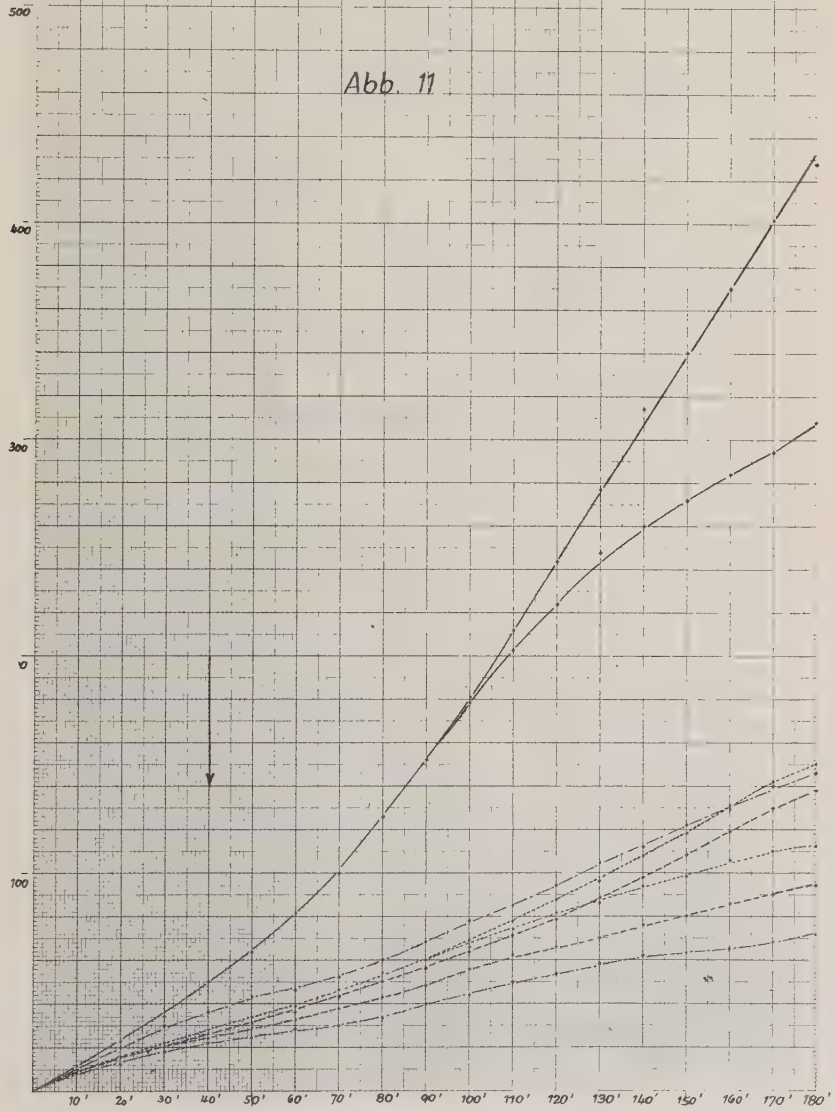






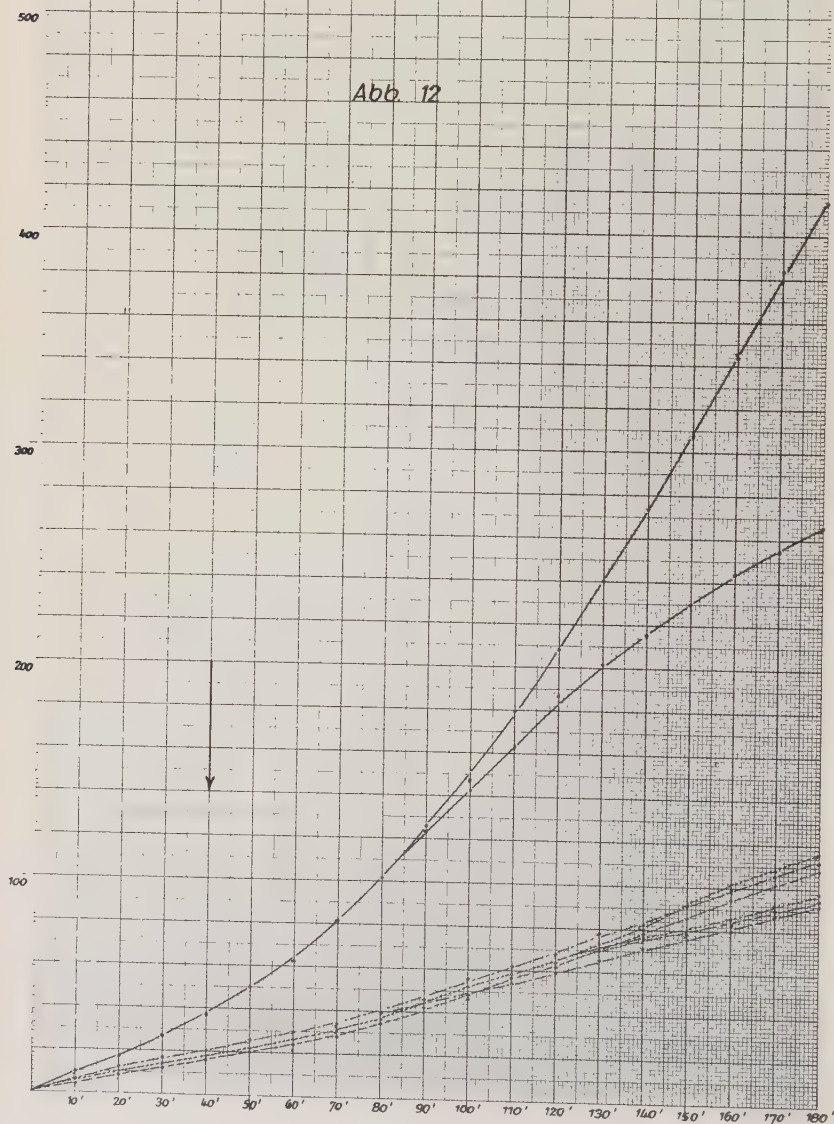
Kontrolle
 1 : 25
 1 : 10
 1 : 5

Abb. 11



Kontrolle
 1:25
 1:10
 1:5

Abb 12



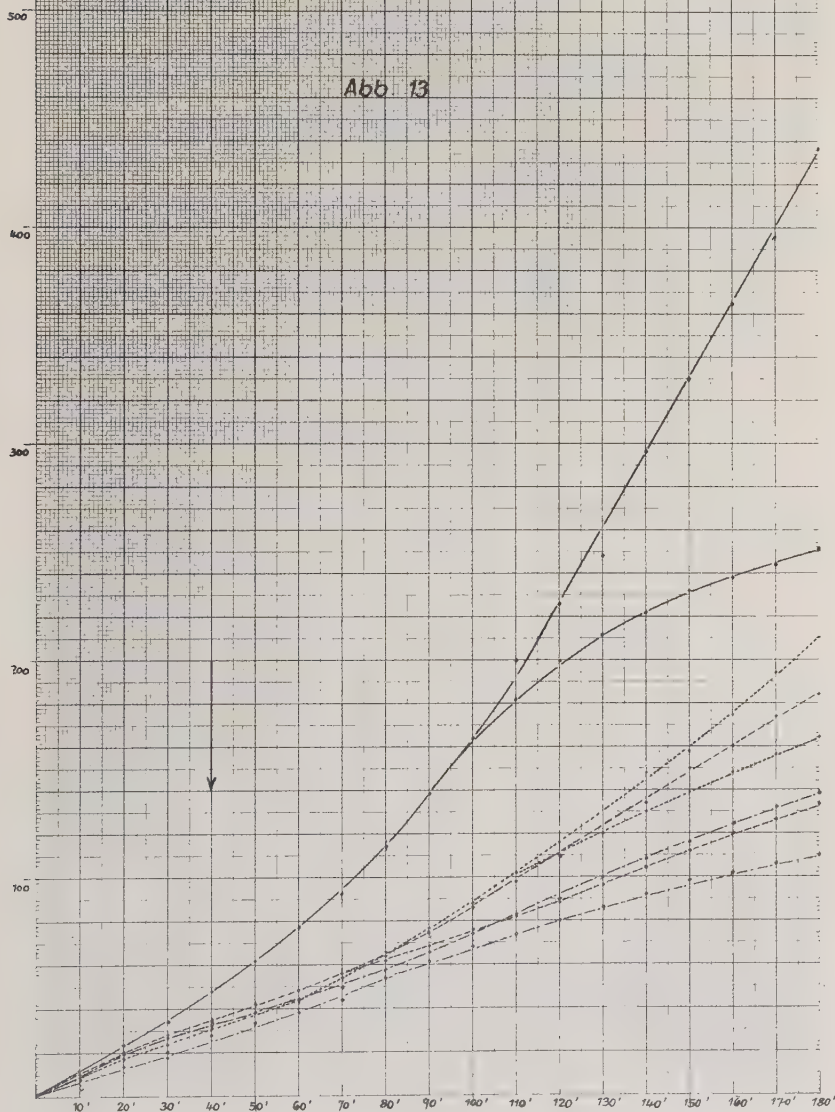
Kontrolle

$f = 25$

$\lambda = 10$

$\tau = 5$

Abb 13



Kontrolle

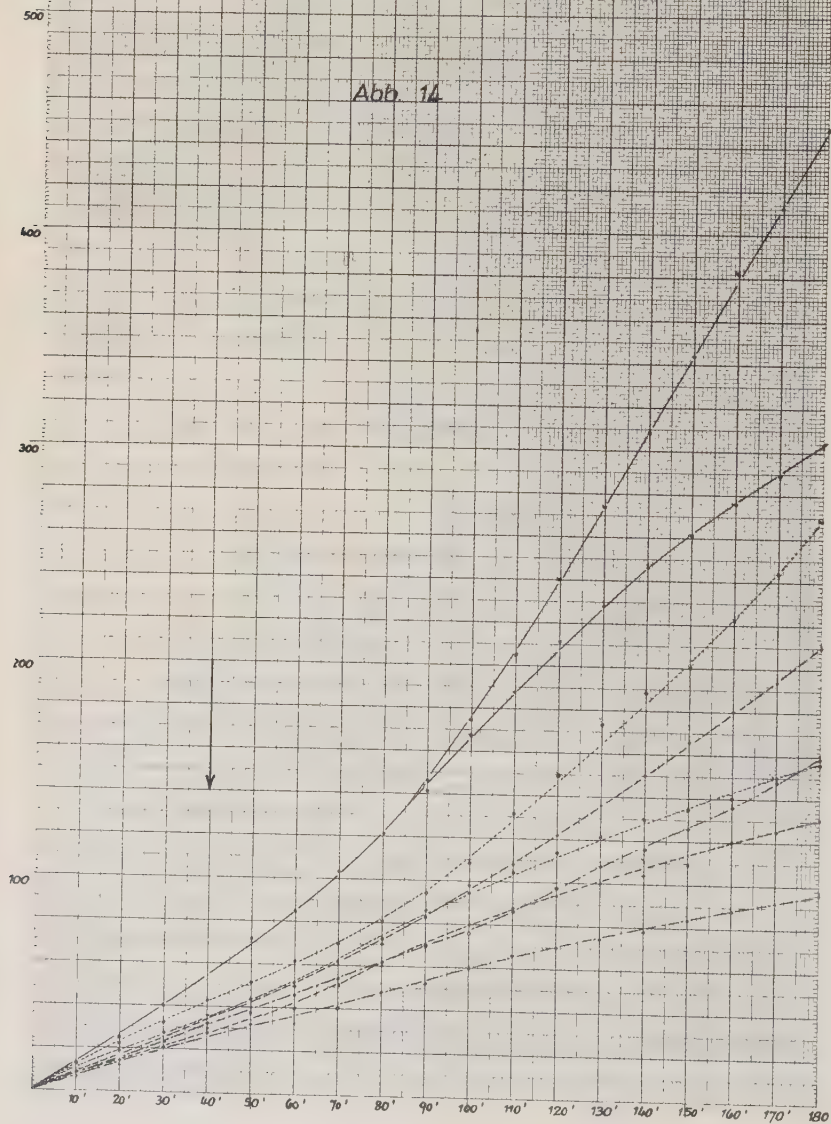
1 : 25

1 : 10

1 : 5

5

Abb. 14



Versuch 4: Dieser Versuch entspricht dem vorhergehenden, jedoch wurde inaktiviertes Has benutzt. Auch dieser Versuch wurde zweimal in gleicher Weise durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 9 und 10 wiedergegeben. Aus Abb. 9 und 10 ist zu entnehmen, daß auch das inaktive Has den O_2 -Verbrauch des Teststamms hemmt. Auch hier ist wiederum deutlich, daß die größte Serumverdünnung, d.h. die geringste Konzentration, den ausgeprägtesten Hemmeffekt hat.

Auch bei dieser Versuchsserie wird der Pc-Effekt durch die Anwesenheit von Serum verstärkt.

In Bestätigung der seitherigen Beobachtungen scheint der Serumeffekt in Gegenwart von Pc aber weniger ausgeprägt zu sein, zumindest bei der höchsten Serumverdünnung von 1 : 25, als im Pc-freien Ansatz.

Versuch 5: In diesem Versuch diente *M. pyog. var. aureus* Sg 40 (nicht-Penasebildner) als Testkeim (Keimendkonz. = 4×10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 180 E Pc/ml). Als Serum wurde aktives Has benutzt. Die Versuche wurden zweimal durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abb. 11 und 12 wiedergegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß auch hier das aktive Has den O_2 -Verbrauch des Teststammes hemmt. Eine Abhängigkeit von der Serumkonzentration ist bei beiden Versuchsserien nicht zu beobachten. Auch in Gegenwart von Pc kommt es zu einem zusätzlichen Serumeffekt. - Wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei Sg 511, so scheint doch auch hier in Gegenwart von Pc der zusätzliche Serumeffekt nicht so deutlich zu sein.

Versuch 6: Diese ebenfalls doppelt angesetzte Versuchsserie entspricht dem Versuch 5, jedoch wurde inaktives Has benutzt. Aus den Abb. 13 und 14 ist zu entnehmen, daß die Ergebnisse etwa gleich denen mit aktivem Serum sind, jedoch ist hier stets, d.h. also auch in Gegenwart von Pc, die höchste Serumverdünnung, d.h. die geringste Serumkonzentration am wirksamsten.

Für alle diese Versuche (1 - 6) ist zu sagen, daß nach Zugabe von Pc, aber ohne Serum die Kurve des O_2 -Verbrauchs als Ausdruck der Pc-Wirkung umknickt, was in Gegenwart von Serum (und Pc) in keinem Fall zu beobachten war. Bei den Versuchen mit Pc und Serum kommt es zu einem insgesamt langsameren Anstieg der Kurven.

Ferner wurde bei den Versuchen 1 - 6 beobachtet, daß sich in Anwesenheit von Serum die Kultur in den Warburgkölbchen nach einer Versuchszeit von

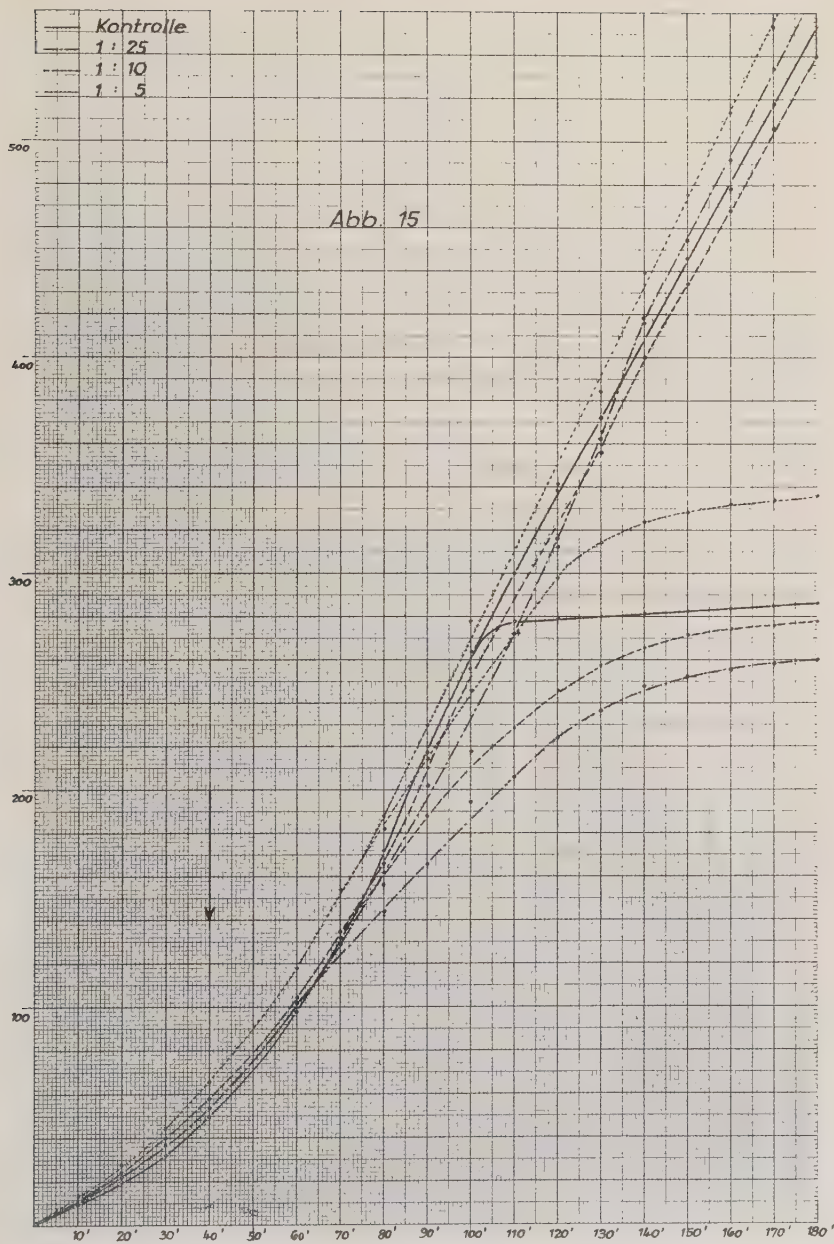
3 Stunden nicht homogen trübte, wie es in Abwesenheit des Serums der Fall war. Es bildeten sich mehr oder weniger große Zusammenballungen von Staphylokokken, was sich kulturell und mikroskopisch verifizieren ließ. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit denen im Dilutionstest.

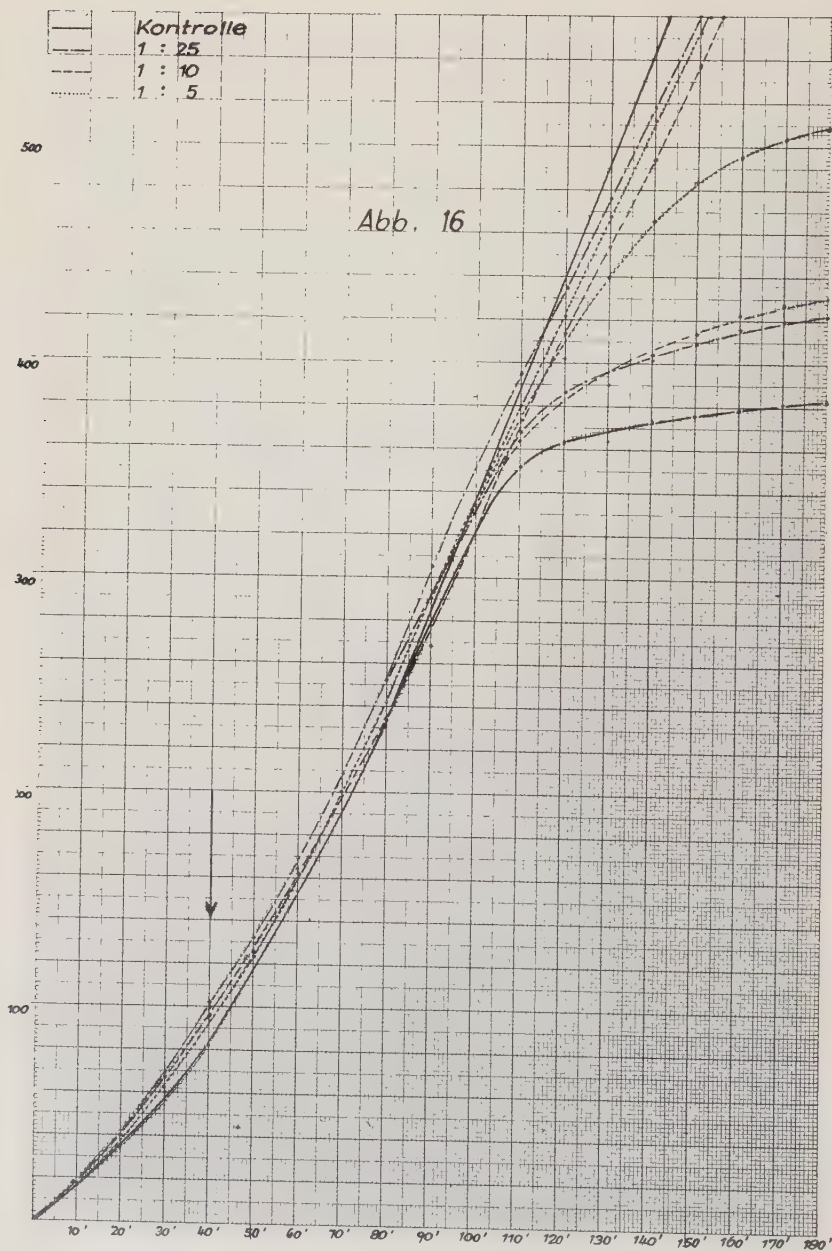
Versuch 7: In diesem Versuch wurden aktives Hus und Sg 511 als Testkeim benutzt (Keimendkonz. = 10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 0,7 E Pc/ml). Die Ergebnisse sind in Abb.15 wiedergegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß das aktive Hus auf den O_2 -Verbrauch von Sg 511 keinen wesentlichen Einfluß hat. Es fällt lediglich auf, daß die stärkste Serumkonzentration, d.h. die Verdünnung 1 : 5, den O_2 -Verbrauch bei einer längeren Beobachtungszeit etwas erhöht. Dieses Ergebnis konnte noch deutlicher bei einer Wiederholung desselben Versuches reproduziert werden.

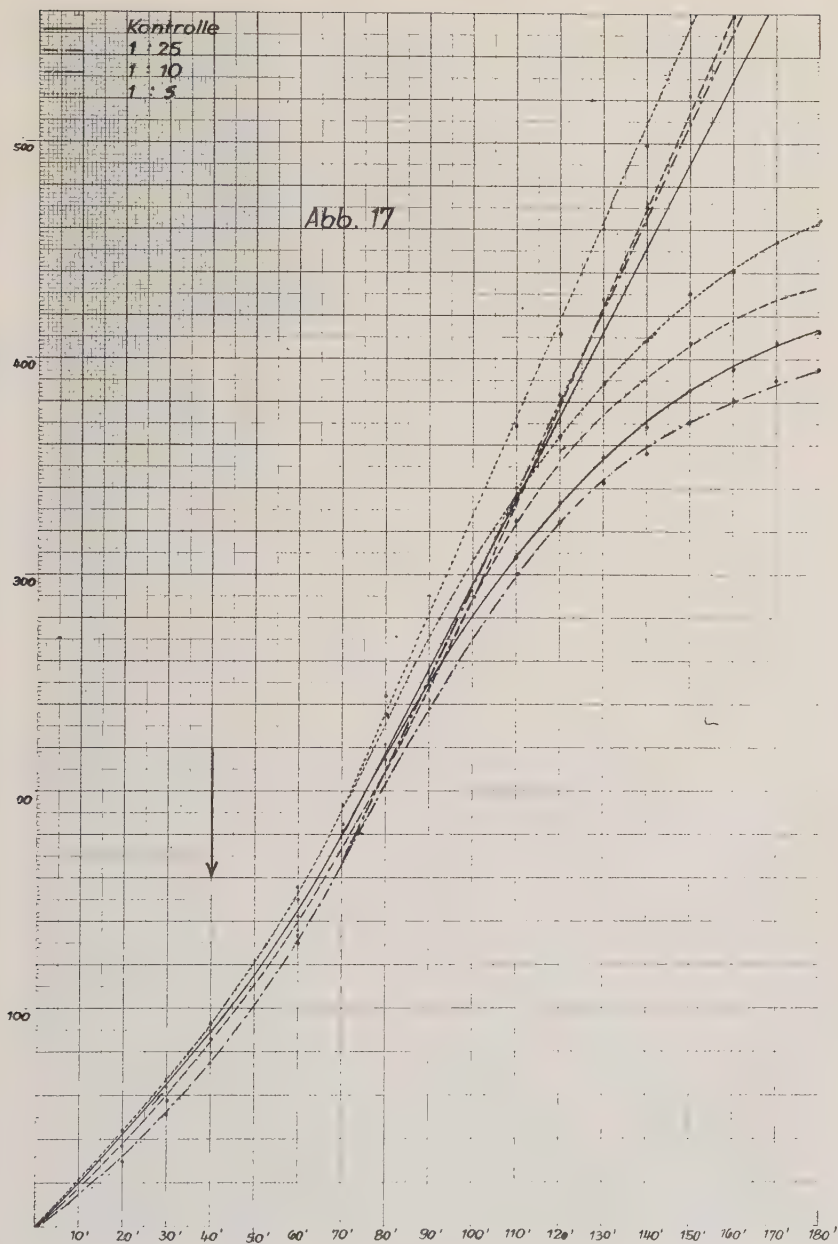
In Gegenwart von Pc ist bei den höheren Serumverdünnungen von 1 : 10 und 1 : 25 ein geringer O_2 -Verbrauch festzustellen, während bei der geringsten Serumverdünnung 1 : 5, also bei der höchsten Serumkonzentration, der O_2 -Verbrauch deutlich höher liegt als bei entsprechender Kontrolle ohne Serum. Auch dieses Resultat war bei der Wiederholung prinzipiell das gleiche.

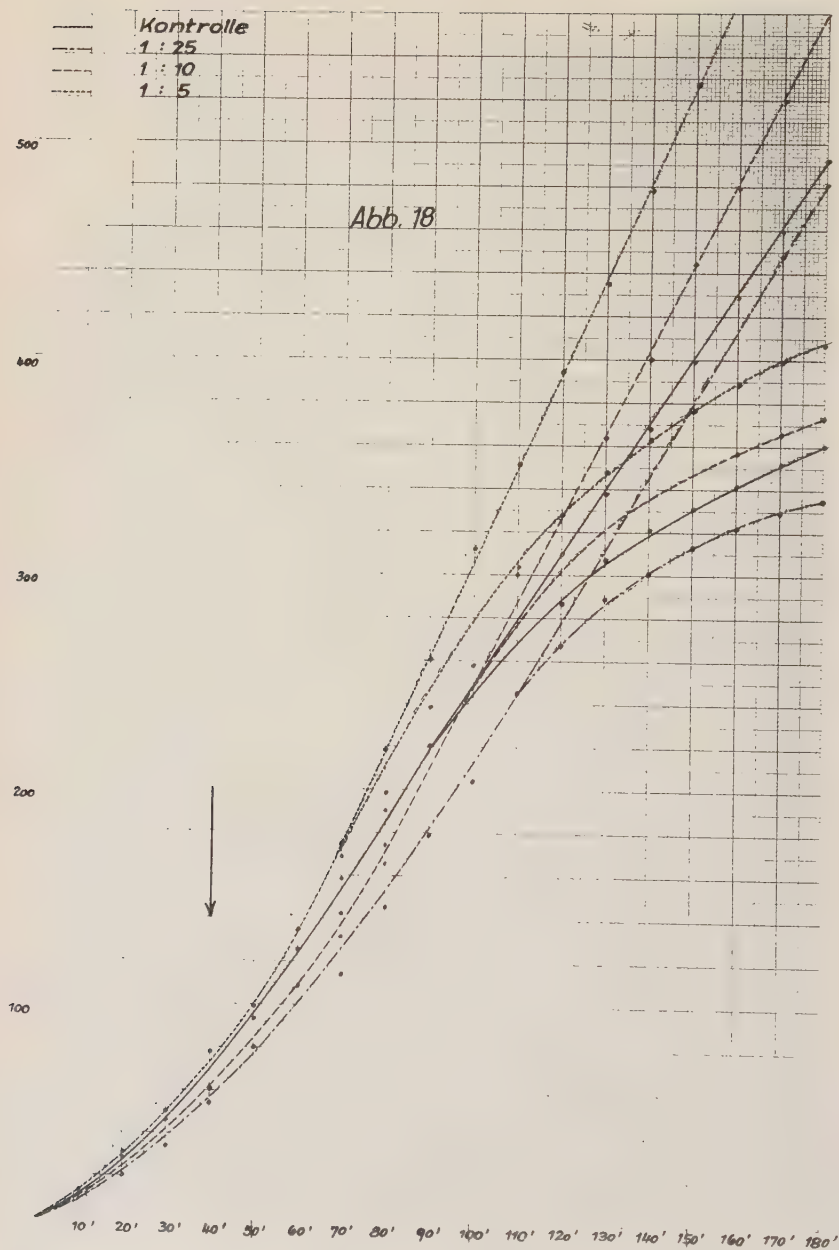
Versuch 8: Dieser Versuch entspricht in seinem grundsätzlichen Ansatz dem vorgenannten Versuch 7, jedoch wurde nun inaktiviertes Hus benutzt. Die Ergebnisse sind in der Abb.16 wiedergegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß das inaktivierte Hus keinen nennenswerten Einfluß auf den O_2 -Verbrauch der Testkeime hat. Wurden die Versuche aber in Gegenwart von Pc durchgeführt, dann ist der O_2 -Verbrauch in Gegenwart von Serum stets höher als der in der Kontrolle, und zwar in Abhängigkeit von der Konzentration.

Versuch 9: Bei diesem Versuch wurde der Einfluß von aktivem Hus auf den Penasebildner Re 1875 untersucht (Keimendkonz. = 10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 28125 E Pc/ml). Die Ergebnisse sind in den Abb.17 und 18 wiedergegeben. Die Versuche wurden zweimal in gleicher Weise durchgeführt. Aus den Abb.17 und 18 ist übereinstimmend zu entnehmen, daß vor allen Dingen die niederen Serumverdünnungen von 1 : 10 und 1 : 5 zu einem größeren O_2 -Verbrauch führen. In Gegenwart von Pc sind die Werte mit der höchsten Serumverdünnung von 1 : 25 in beiden Versuchsserien kleiner als die der Kontrolle und mit den beiden höheren Serumkonzentrationen 1 : 5 und 1 : 10 größer als die Kontrolle. Man gewinnt also den Eindruck, als sei bei der höchsten Serumverdünnung die Sensibilität der Testkeime erhöht worden im Gegensatz zu den größeren Serumkonzentrationen.



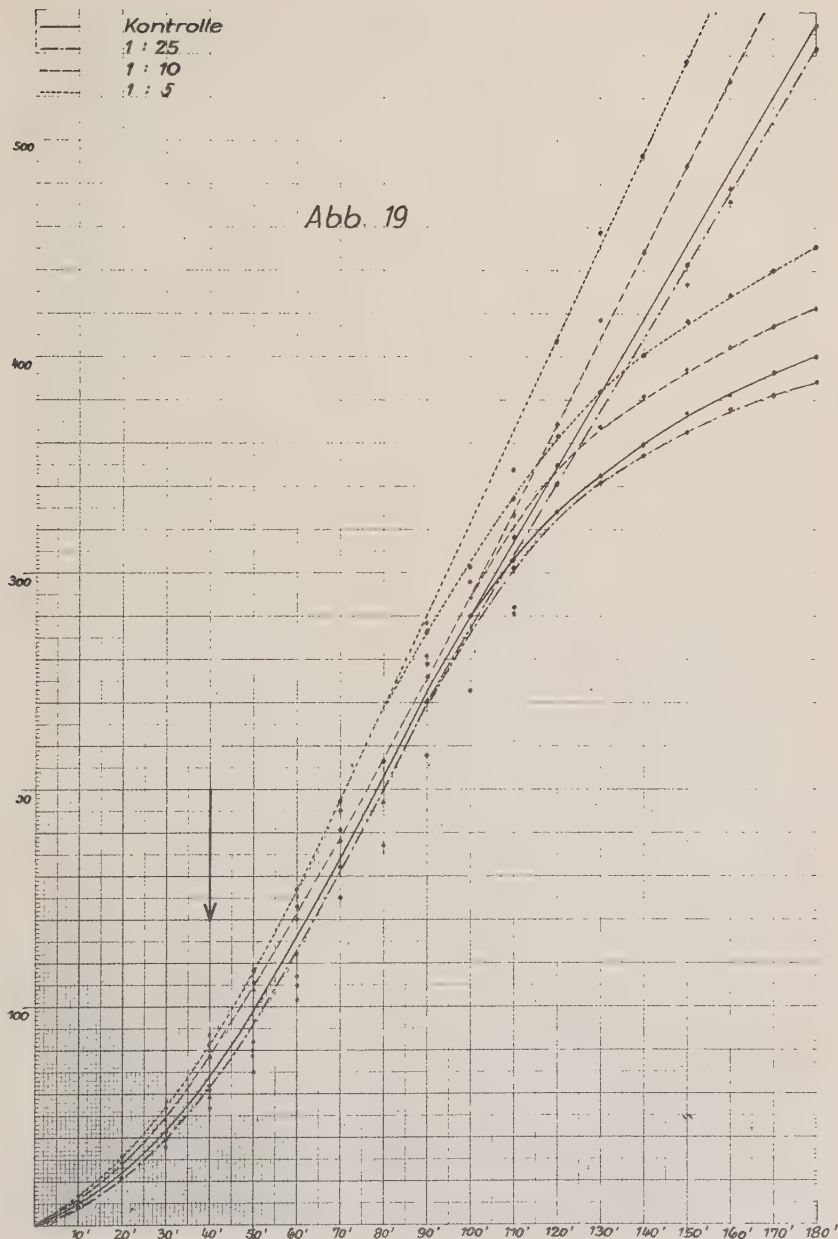






— Kontrolle
 - - - 1 : 25
 - - - 1 : 10
 - - - 1 : 5

Abb. 19



— Kontrolle
 - - - 1 : 25
 - - - 1 : 10
 1 : 5

500

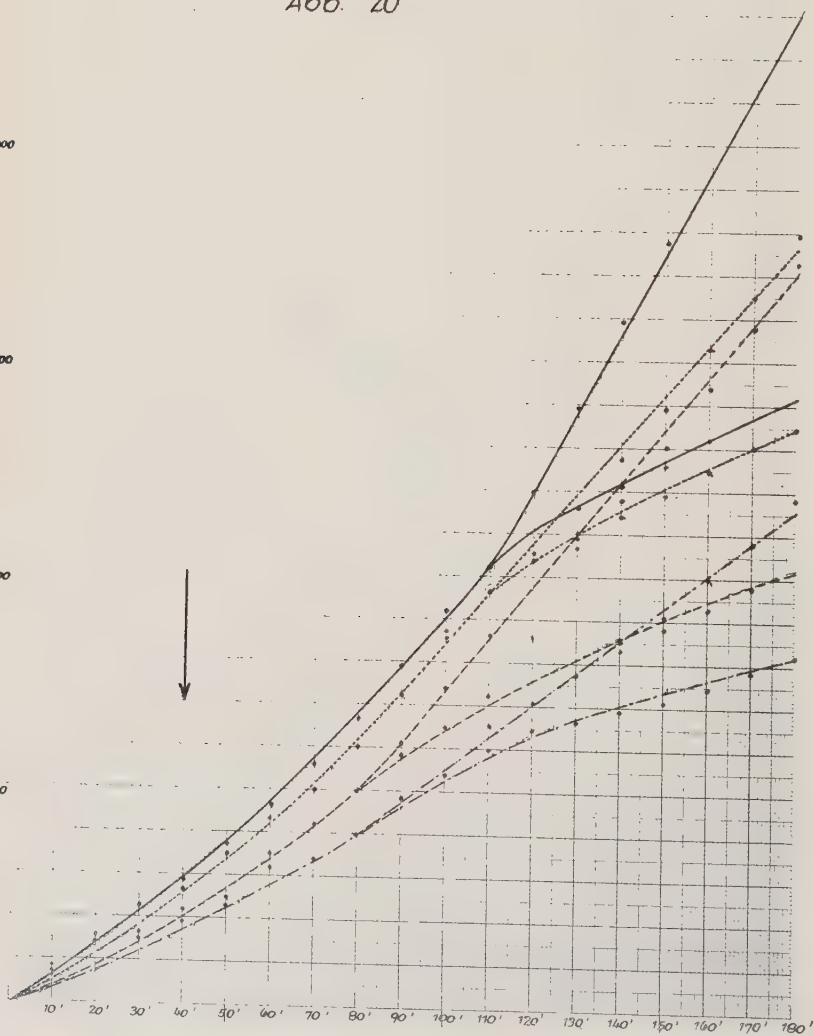
Abb. 20

400

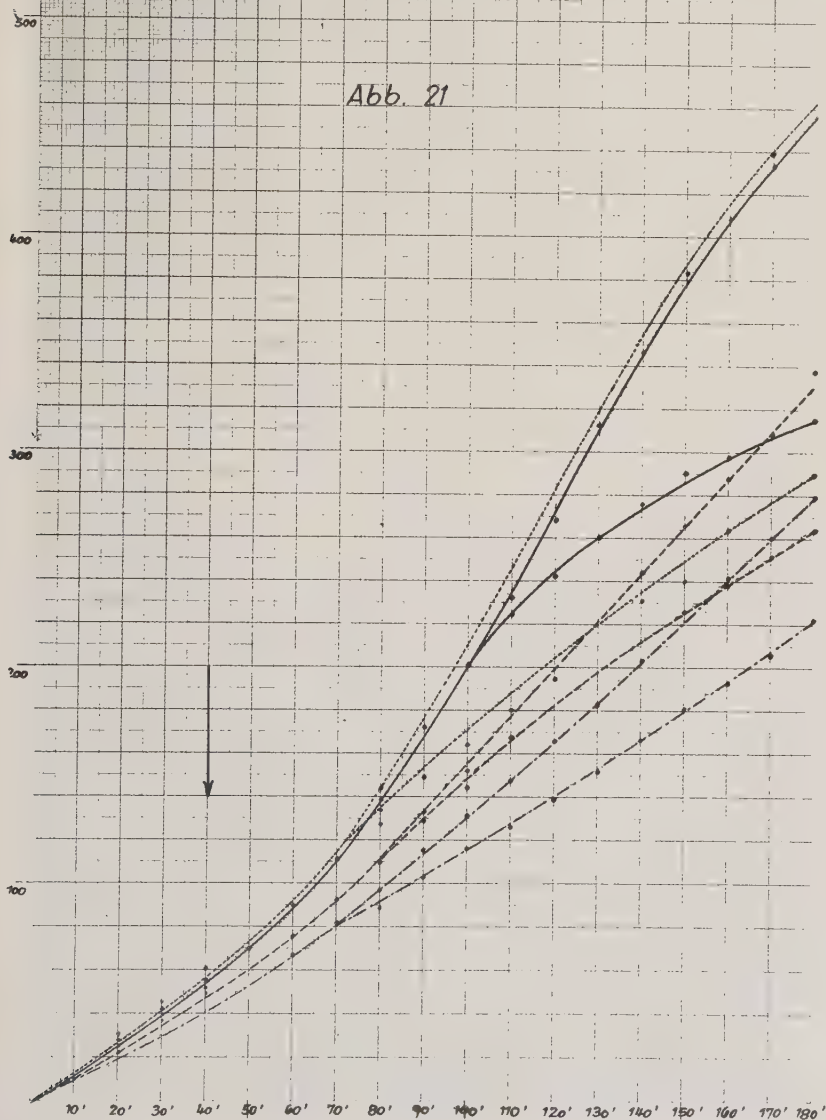
300

200

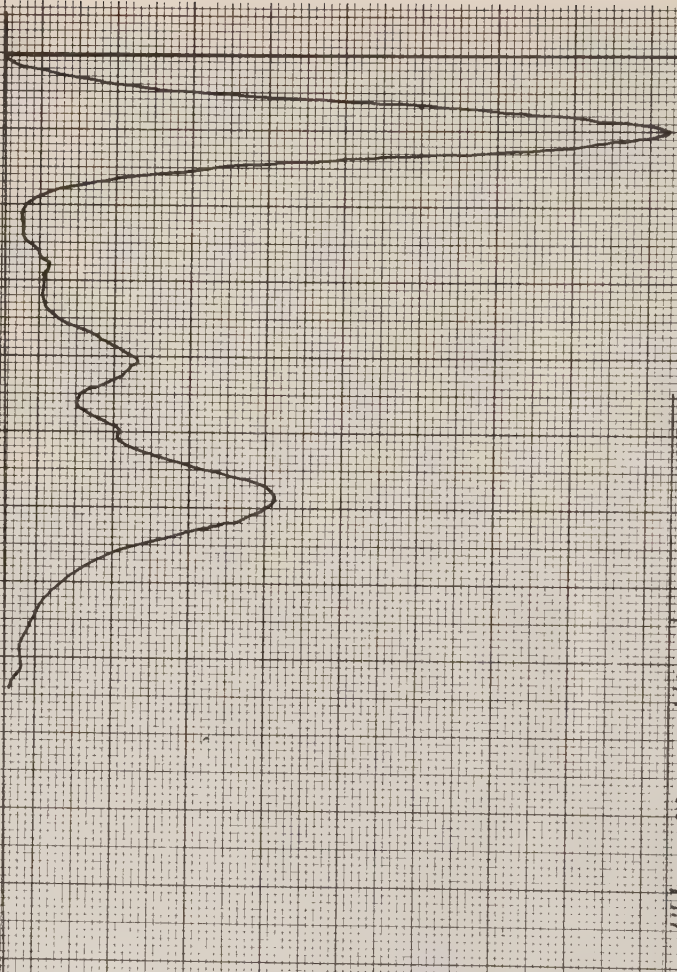
100



1:5



Fractionen	Albumin	α_1	α_2	β	γ	Summe
Plasmaproteine	47.7	1.8	4.6	3.0	18.7	39.2
Relativ %	45.1	2.0	11.7	9.6	32.4	100 %



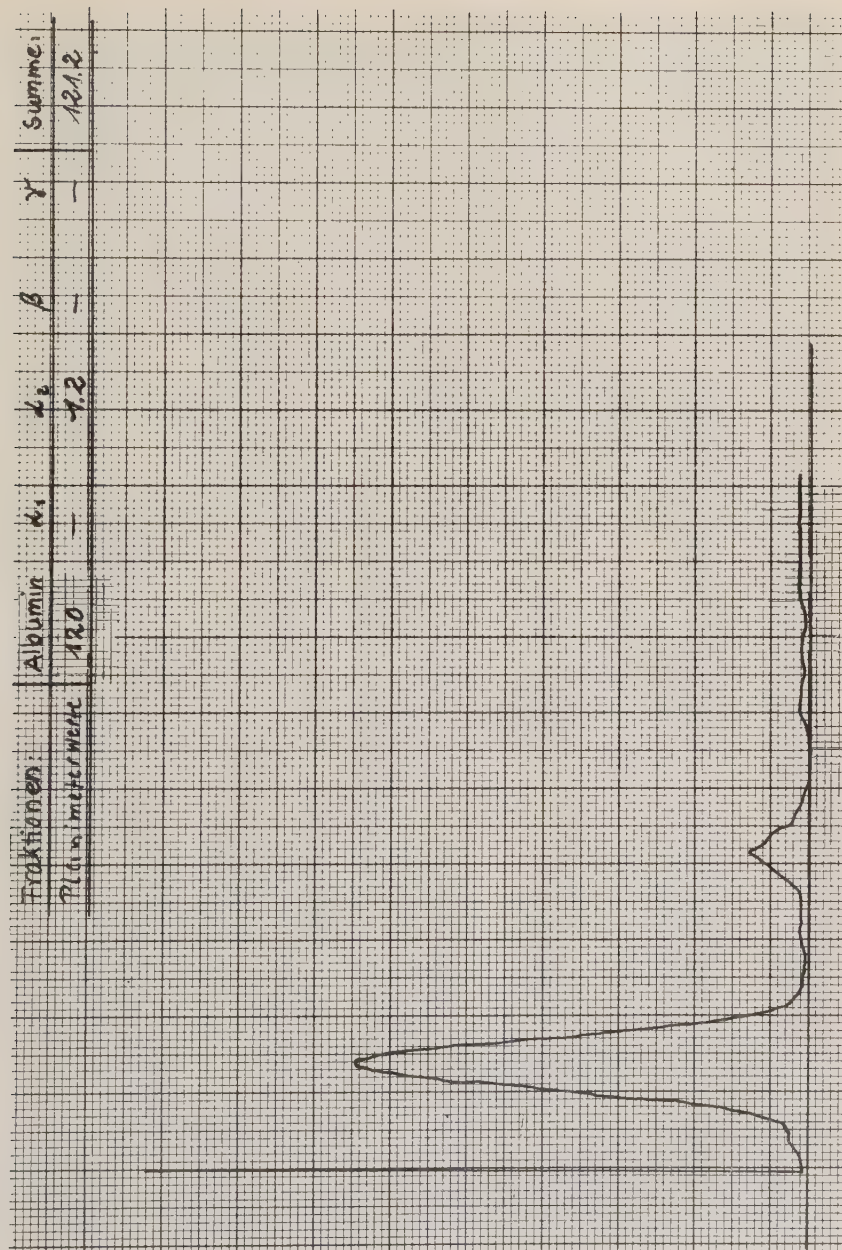


Abb. 23

Fraktionen	Albumin	α_1	α_2	β	γ	Summe
Flachmesswert	-	-	-	-	119	119

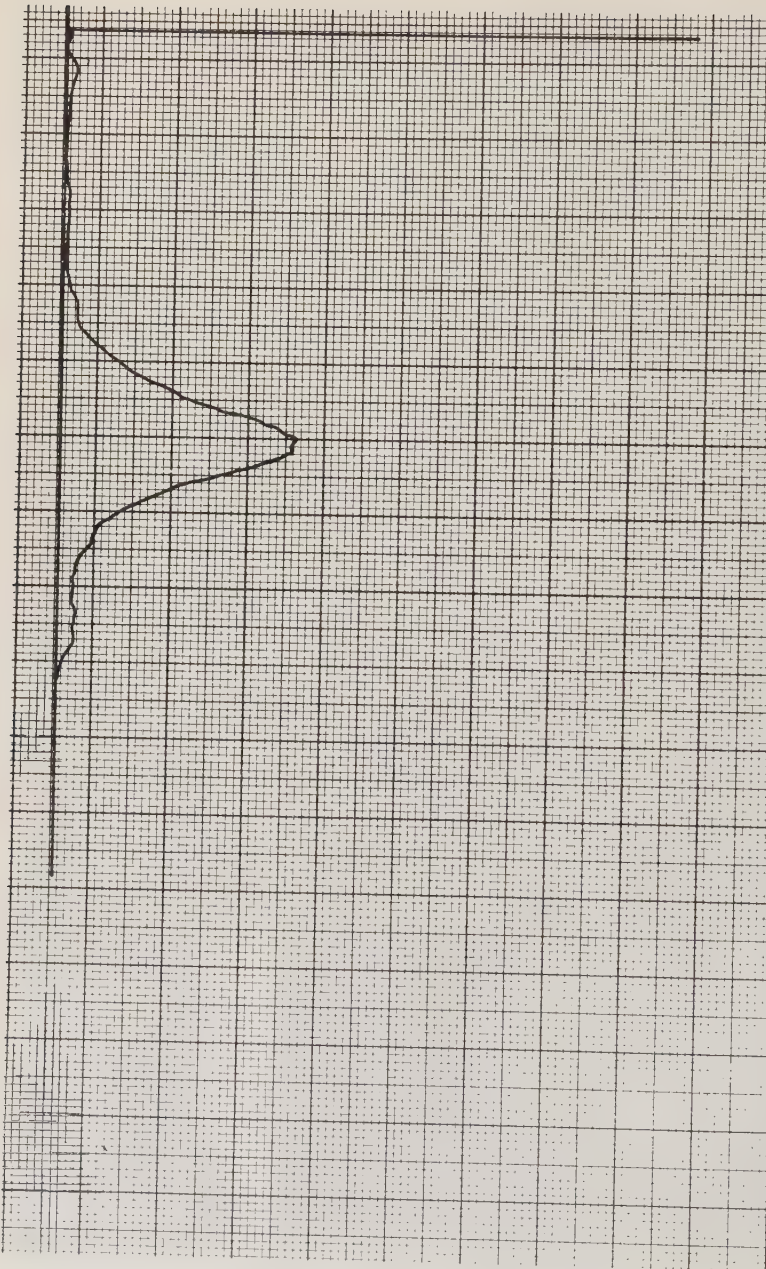
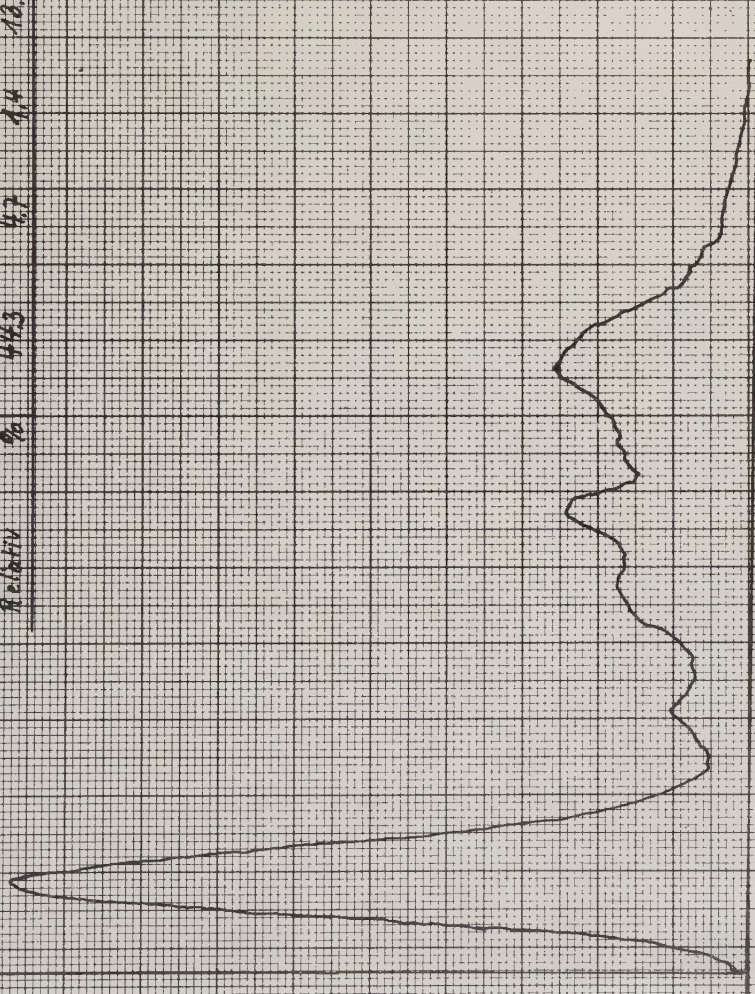
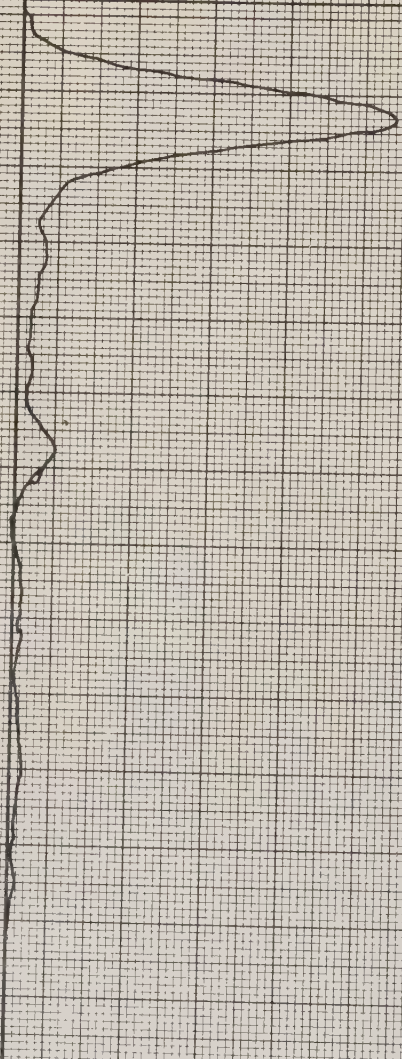


Abb. 24

Fractionen:	Albumin	d_1	d_2	β	γ	Summe
Quantitative	22.5	23	46	67	124	485
Relativ	%	47	44	189	255	100 %



Fraktion	Albumin	α_1	α_2	β	γ	Summe
Plasmamembran	12.4	—	—	0.8	—	12.1.8



Versuch 10: Dieser Versuch entspricht völlig dem Nr.9, jedoch wurde inaktives Hus benutzt. Auch in diesem Falle wurden die Versuche doppelt angesetzt. Diese beiden Ergebnisse sind völlig identisch, so daß das Resultat nur in Abb.19 wiedergegeben wird. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß bei Verwendung dieses Testkeims prinzipiell kein Unterschied zwischen der Einwirkung von aktivem und inaktivem Hus besteht.

Versuch 11: In diesem Versuch wurde aktives Hus und der nicht-penasebildende Stamm Sg 40 benutzt (Keimendkonz. = 4×10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 71 E Pc/ml). Auch dieser Versuch wurde in zwei identischen Serien durchgeführt. Die Ergebnisse entsprechen sich völlig, so daß nur die Resultate einer Serie in Abb.20 wiedergegeben sind. Daraus ist zu entnehmen, daß aktives Hus den O₂-Verbrauch des Teststammes hemmt, und zwar in umgekehrter Relation zur Serumkonzentration. Dasselbe ist der Fall in Gegenwart von Pc.

Versuch 12: Dieser Versuch entspricht dem vorgenannten, jedoch wurde inaktives Hus benutzt. Von den ebenfalls doppelten Ansätzen wird nur das Resultat einer Serie in der Abb.21 wiedergegeben, da sich die Ergebnisse entsprechen. Aus der Abb.21 ist zu entnehmen, daß aktives und inaktives Serum zu prinzipiell dem gleichen Resultat führen.

Bei den weiteren Versuchen wurden Serumfraktionen statt Vollserum verwandt.

Die Albumin- und γ -Globulinfraktionen wurden, wie eingangs beschrieben, gewonnen und mit phys. NaCl-Lösung auf das ursprüngliche Serumvolumen aufgefüllt. Nach papierelektrophoretischer Darstellung des Eiweißbildes wurden durch Vergleich der Planimeterwerte die Konzentrationen der einzelnen Eiweißfraktionen berechnet. Die Eiweißverteilungskurven sind in den Abb.22 bis 24 für das Has und in den Abb.25 bis 27 für das Hus aufgezeichnet und die errechneten Werte in Tab.8 wiedergegeben.

Tabelle 8:

Serum	Fraktionen	Gesamtserum Frakt. in %	vorhand. Prozentsatz d. Fraktionen	
			Alb. Frakt.	γ -Glob. Frakt.
Hammel	Albumine	45,1	67,7	-
	α_1 -Glob.	2,0	-	-
	α_2 -Glob.	11,7	2,8	-
	β -Glob.	7,6	-	-
	γ -Glob.	32,1	-	93,4
Mensch	Albumine	44,3	53,7	-
	α_1 -Glob.	4,7	-	-
	α_2 -Glob.	9,4	-	-
	β -Glob.	13,9	1,2	-
	γ -Glob.	25,5	-	55,6

Aus Tab. 8 ist zu entnehmen, daß die Albuminfraktion von Has nur noch eine kleine Verunreinigung von α_2 -Globulinen und die Albuminfraktion des Hus eine solche von β -Globulinen besitzt. Die γ -Globulinfraktion ist elektrophoretisch rein, jedoch wurde bei humanem γ -Globulin ziemlich viel verloren.

Die Versuche mit Bakterien wurden in der Weise angesetzt, daß die genannten Fraktionen mit verschiedenen Verdünnungsgraden benutzt wurden. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Vollserum wurde hier wegen der gelegentlich geringeren γ -Globulinkonzentration schon mit einer Verdünnung von 1 : 2 begonnen.

Die bakteriologischen Untersuchungen der Fraktionen ergaben im Ausstrich auf Agar nur ganz vereinzelt Keime von Staph. albus und E. coli. Dies konnte bei den Warburgversuchen wegen der Kürze der Versuchsdauer und der großen Zahl der Impfkeime vernachlässigt werden.

Versuch 13: In diesem Versuch wurden die γ -Glob. aus Has unter Verwendung von Sg 511 ausgetestet und in Abb. 28 wiedergegeben (Keimendkonz. = 10^8 K/ml, Pc Endkonz. = 0,7 E Pc/ml). Aus Abb. 28 ist zu entnehmen, daß das γ -Globulin von Has den O_2 -Verbrauch in Abhängigkeit von der Konzentration senkt. Die Pc-Wirkung wird ebenfalls deutlich verstärkt, jedoch nur in dem Maße, daß keine Konzentrationsabhängigkeit zu erkennen ist.

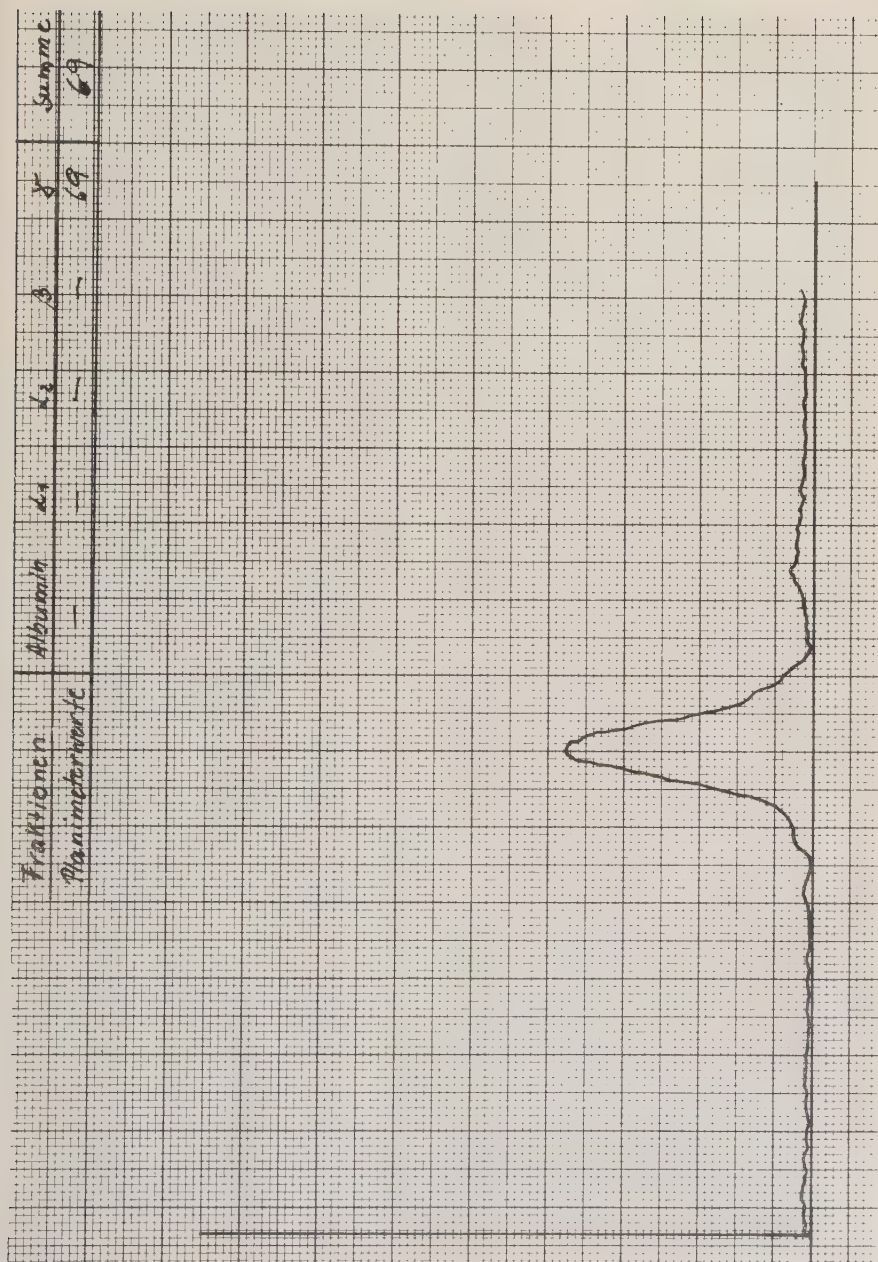
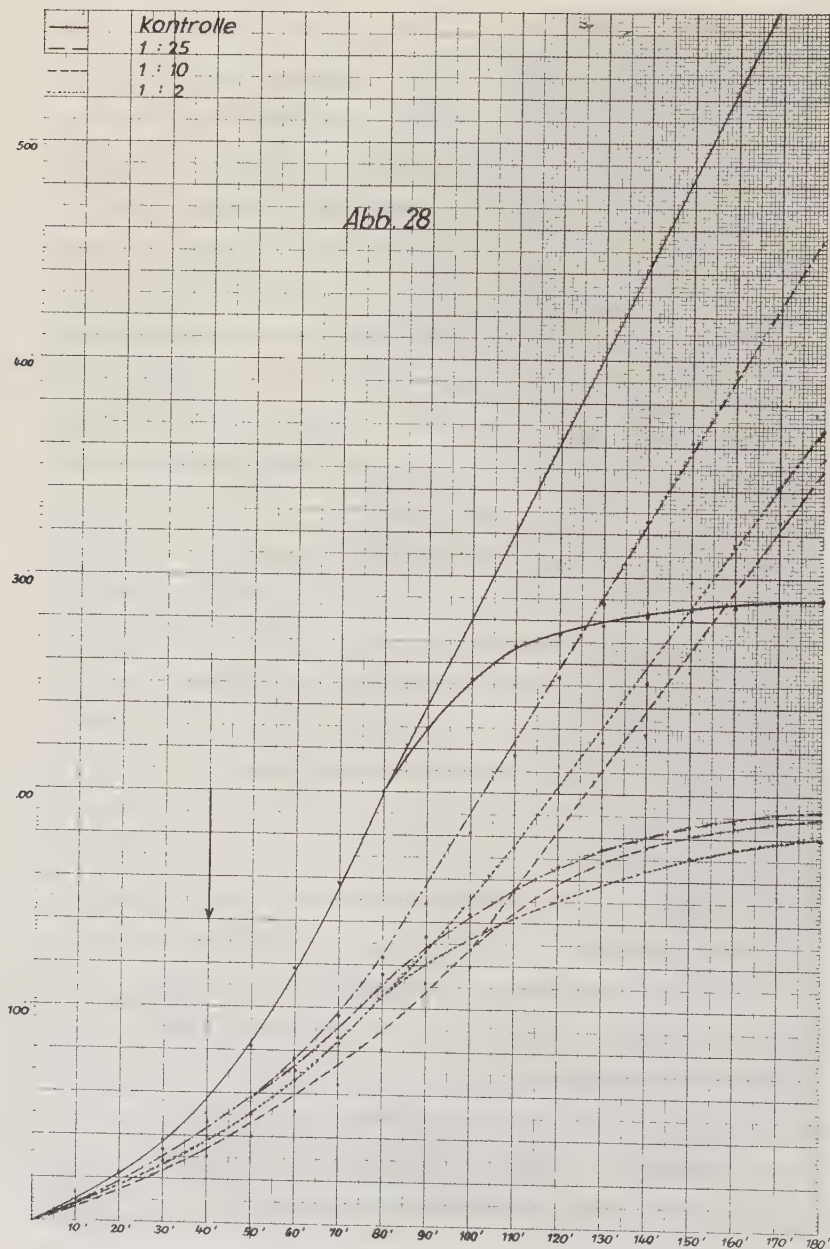


Abb. 27



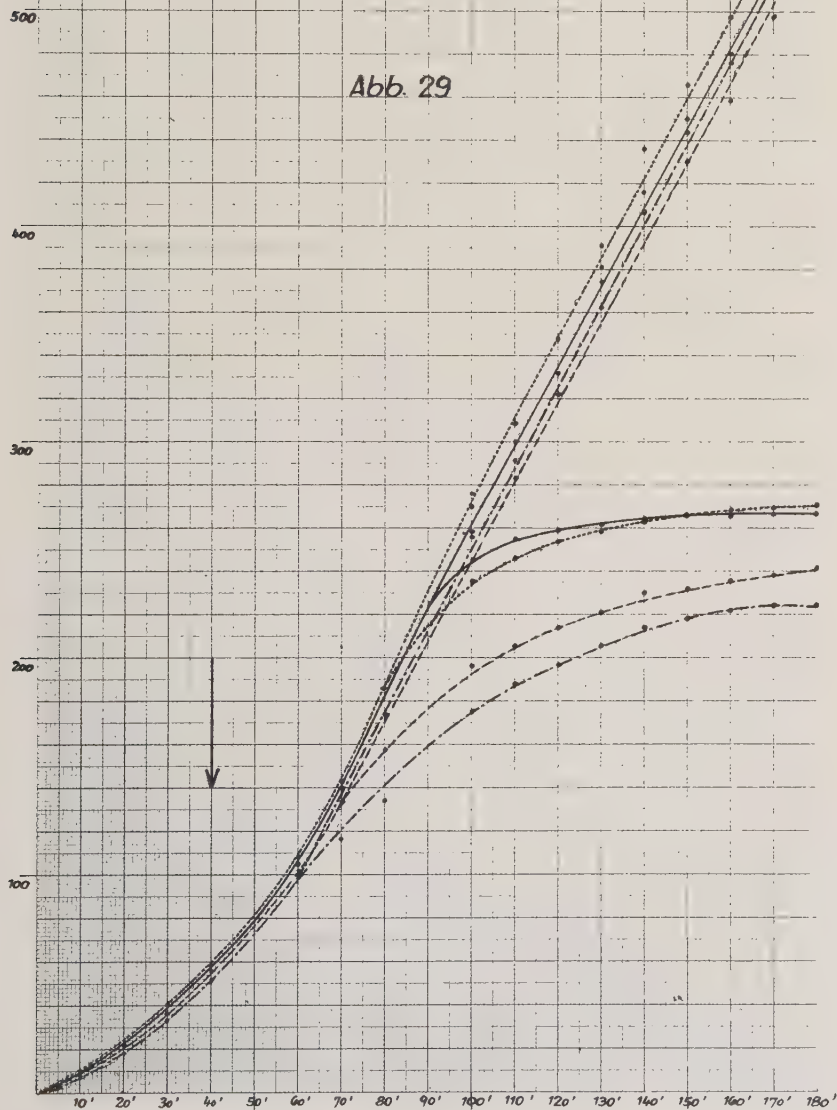
Kontrolle

1 : 25

1 : 10

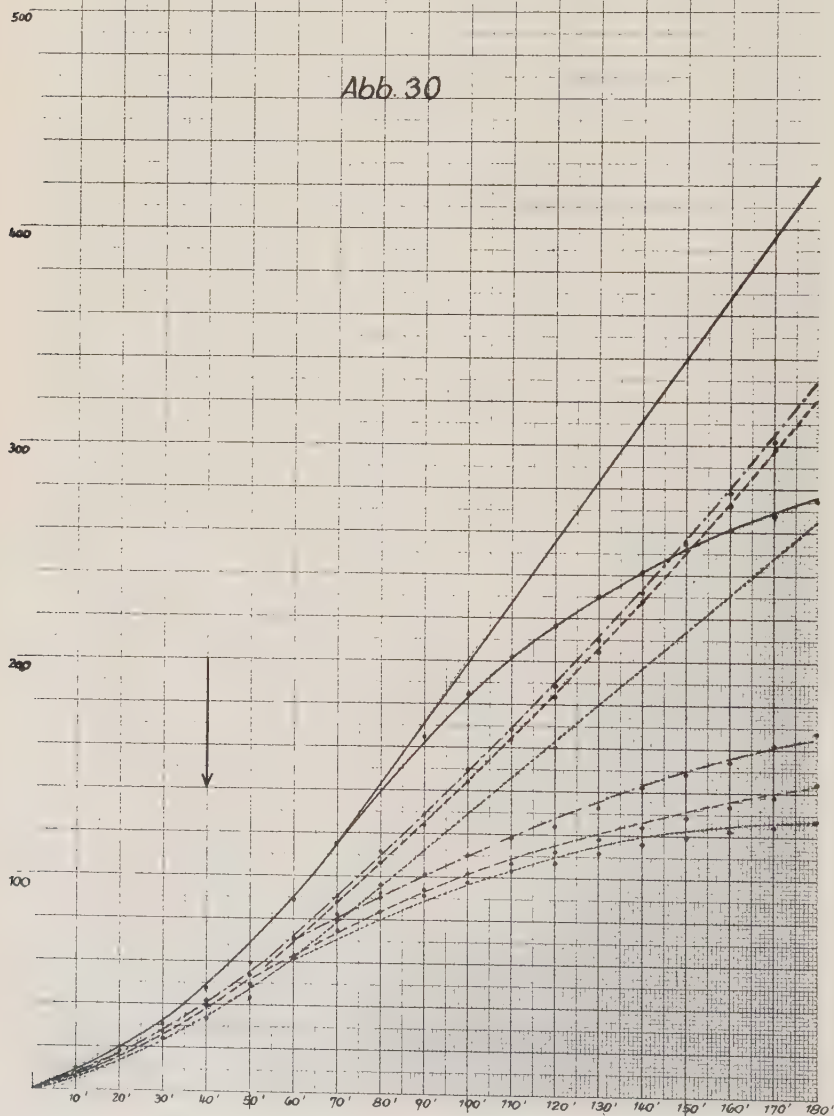
1 : 2

Abb. 29



— Kontrolle
 - - - 1 : 25
 - - - 1 : 10
 - - - 1 : 2

Abb. 30



Kontrolle 31

$\lambda = 25$

$\lambda = 10$

$\lambda = 2$

Abb 31

500

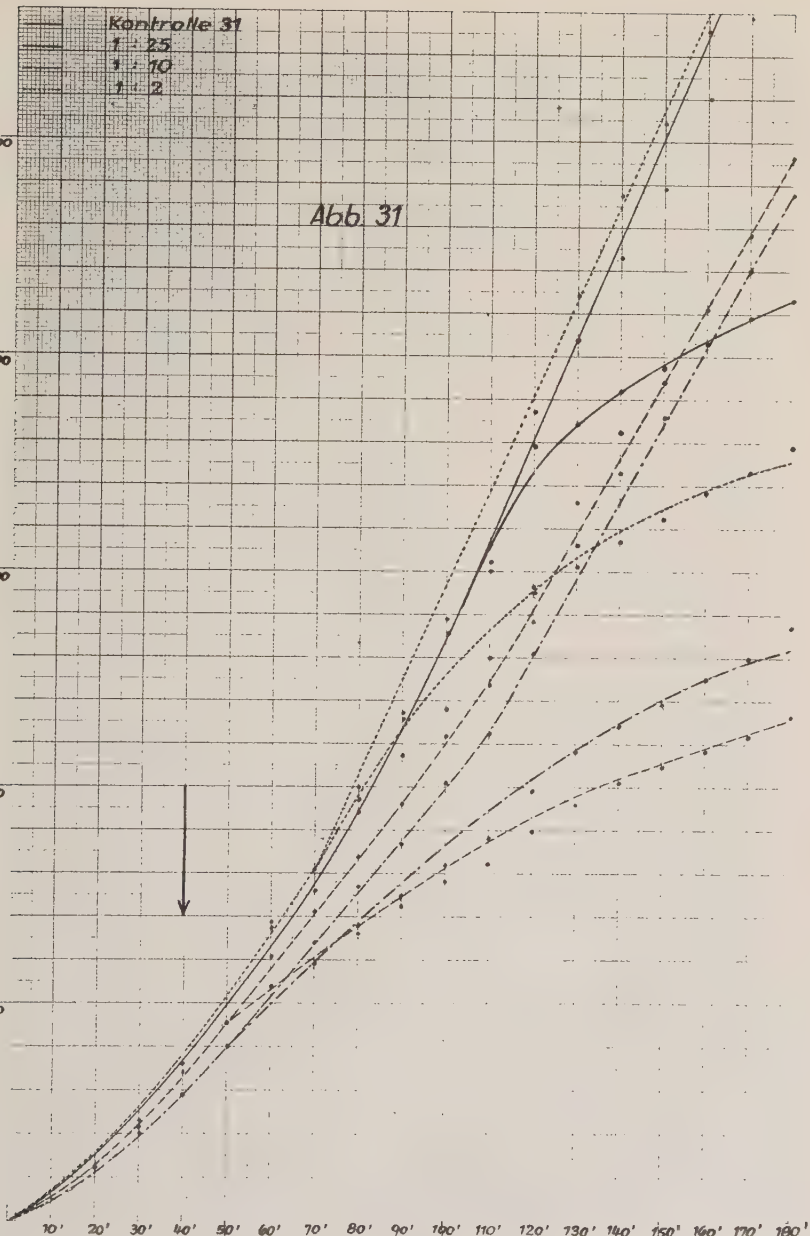
400

300

200

100

10' 20' 30' 40' 50' 60' 70' 80' 90' 100' 110' 120' 130' 140' 150' 160' 170' 180'



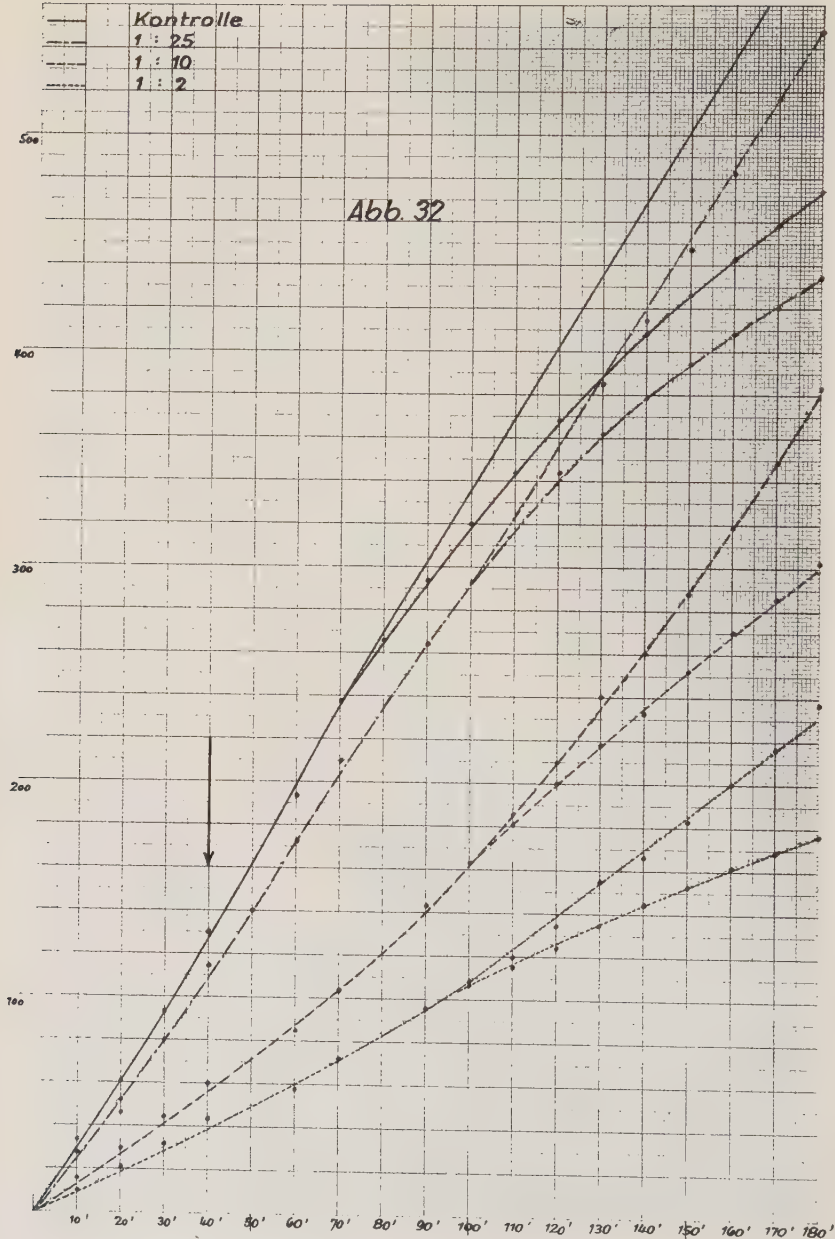
Kontrolle

1 : 25

1 : 10

1 : 2

Abb. 32



Versuch 14: In diesem Versuch wurde humanes γ -Globulin bei Verwendung von Sg 511 untersucht (Endkonzentrationen wie vorher). Die Ergebnisse sind in der Abb.29 zusammengefaßt. Aus dieser Abbildung ist zu entnehmen, daß das humane γ -Globulin keinen Einfluß auf den O_2 -Verbrauch der Testkeime hat. Man könnte vielleicht daran denken, daß dies im Gegensatz zum Versuch mit γ -Globulinen vom Hammel auf einer geringeren Globulinkonzentration der Testlösung zurückzuführen sei. Es kann aber schon jetzt gesagt werden, daß dies unwahrscheinlich ist, da man auch mit der höchsten Verdünnung der Globuline des Hammels noch einen deutlichen Effekt erzielte. In Gegenwart von Pc wird durch die höhere Verdünnung der Testlösungen der Pc-Effekt verstärkt. Damit ist dieser Globulineffekt nicht ganz gleich dem von Hammelglobulin.

Versuch 15: Bei diesem Versuch wurde die γ -Globulinfraktion des Has bei Verwendung des penasebildenden Stammes Re 1875 ausgetestet (Keimendkonz. = 10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 28125 E Pc/ml). Die Ergebnisse sind in Abb.30 wiedergegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß der O_2 -Verbrauch am stärksten durch die höchste Globulinkonzentration gehemmt wird. Dasselbe gilt für die Pc-Versuche. Insgesamt besteht eine gewisse Abhängigkeit von der Globulinkonzentration.

Versuch 16: Bei demselben Teststamm Re 1875 wurde humanes γ -Globulin ausgetestet. Auch hier bewirkt der Globulinzusatz eine Hemmung des O_2 -Verbrauchs, und zwar auch dann, wenn den Versuchsansätzen Pc zugegeben worden war. Gegenüber dem vorgenannten Versuch Nr.15 mit Has kann aber hier beobachtet werden, daß dieser Hemmeffekt am deutlichsten bei Verwendung der höheren Serumverdünnung ist. Damit entspricht dieser Versuch mit dem Teststamm Re 1875 dem entsprechenden Versuch mit dem Pc-sensiblen Stamm Sg 511 und γ -Globulinen. Ergebnisse Abb.31.

Versuch 17: In diesem Versuch wurde die γ -Globulinfraktion von Has auf die Stoffwechselleistung des nicht-penasebildenden Stammes Sg 40 untersucht (Keimendkonz. = 4×10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 750 E Pc/ml). Die Ergebnisse sind in der Abb.32 wiedergegeben. Aus dieser Abb. ist zu entnehmen, daß durch das Globulin der O_2 -Verbrauch des Teststammes in Abhängigkeit von der Konzentration eindeutig gehemmt wird. Dasselbe ist der Fall in Gegenwart von Pc. Die Versuche entsprechen also im Prinzip wieder denen mit dem Testkeim Sg 511 und Re 1875 bei Verwendung desselben Globulins.

Versuch 18: In diesem Versuch wurde humanes γ -Globulin gegen Sg 40 ausgetestet (Endkonz. wie Vers.17). Die Ergebnisse sind Abb.33 zu entnehmen. Daraus ist zu ersehen, daß mit und ohne Pc im Ansatz der O_2 -Verbrauch von Sg 40 gehemmt wird, jedoch am geringsten mit der höchsten Globulinkonzentration und am stärksten mit der größten Globulinverdünnung. Dieser Versuch entspricht demnach prinzipiell den analogen Versuchen mit demselben Globulin und den anderen Teststämmen Sg 511 und Re 1875.

Insgesamt kann zu diesen Versuchen (13 - 18) gesagt werden, daß bei verschiedenen Stämmen von *M. pyog. var. aureus*, unabhängig von der Penaseildung, die γ -Globuline vom Hus und vom Has den O_2 -Verbrauch hemmen. Im Fall einer Anwesenheit von Pc wird die Sensibilität teilweise erhöht. Das Humanglobulin hat durchweg die beste Wirkung in einer geringeren Konzentration im Gegensatz zum Globulin aus Has, welches eine konzentrationsabhängige Hemmung des O_2 -Verbrauchs bewirkt.

Versuch 19: Bei diesem Versuch wurde die Albuminfraktion aus Has gegen Sg 511 ausgetestet (Keimendkonz. = 10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 0,7 E Pc/ml). Die Ergebnisse sind in Abb.34 verzeichnet. Daraus ist zu entnehmen, daß alle verwandten Albuminkonzentrationen den O_2 -Verbrauch des Teststammes nicht beeinflussen. Im Gegensatz dazu findet aber eine zusätzliche und konzentrationsabhängige Verbesserung des Pc-Effektes statt.

Versuch 20: Bei diesem Versuch wurde derselbe Pc-sensible Stamm Sg 511, jedoch Humanalbumin verwendet. Die scheinbar geringe Zunahme des O_2 -Verbrauchs des Teststammes dürfte kaum als bezeichnend anzusehen sein. Dagegen wird der Pc-Effekt ebenso wie mit Albumin von Ham-mel in Abhängigkeit von der Konzentration verbessert. Ergebnisse in Abb.35.

Versuch 21: In diesem Versuch wurde Serumalbumin vom Ham-mel gegen den penasebildenden Stamm Re 1875 ausgetestet (Keimendkonz. = 10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 28175 E Pc/ml). Die Ergebnisse sind in Abb.36 wiedergegeben. Aus dieser Abbildung ist zu entnehmen, daß im Gegensatz zu den beiden vorgenannten Versuchen der O_2 -Verbrauch des Teststammes, mit und ohne Pc im Ansatz, gehemmt wird. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist angedeutet. Dieses Resultat ließ sich bei einer Wiederholung verifizieren.

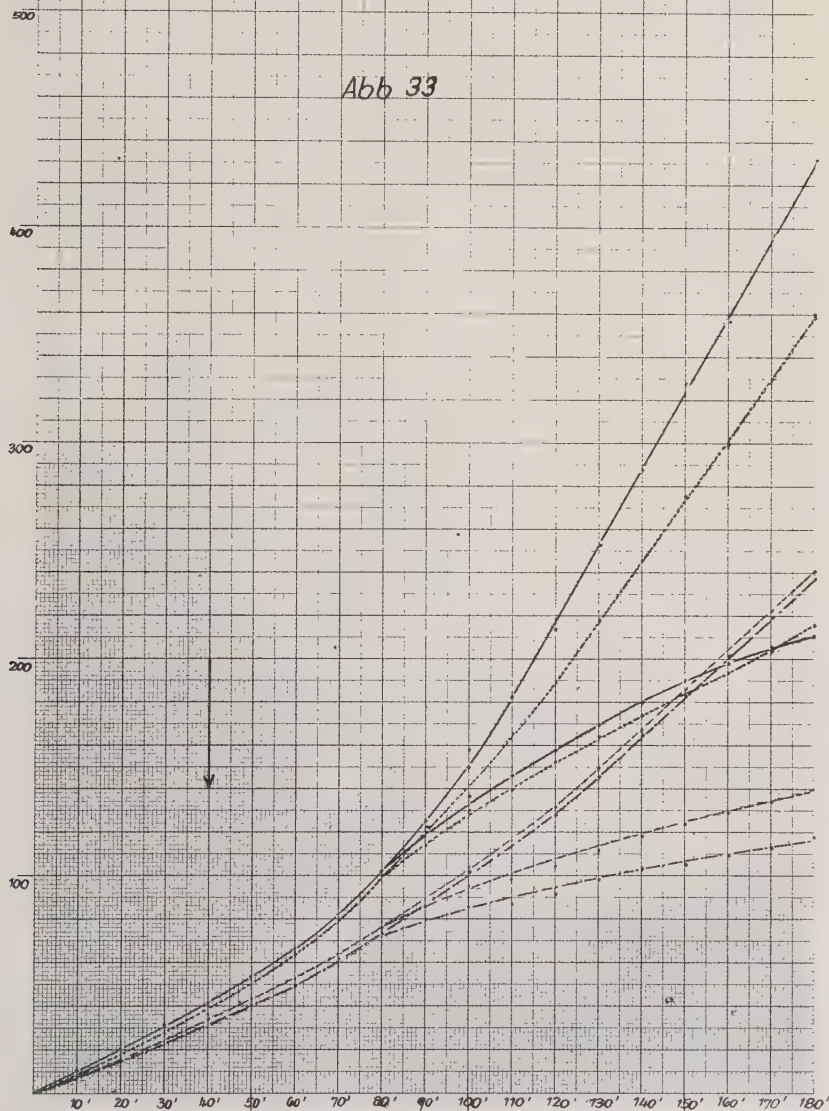
Kontrolle

1 : 25

1 : 10

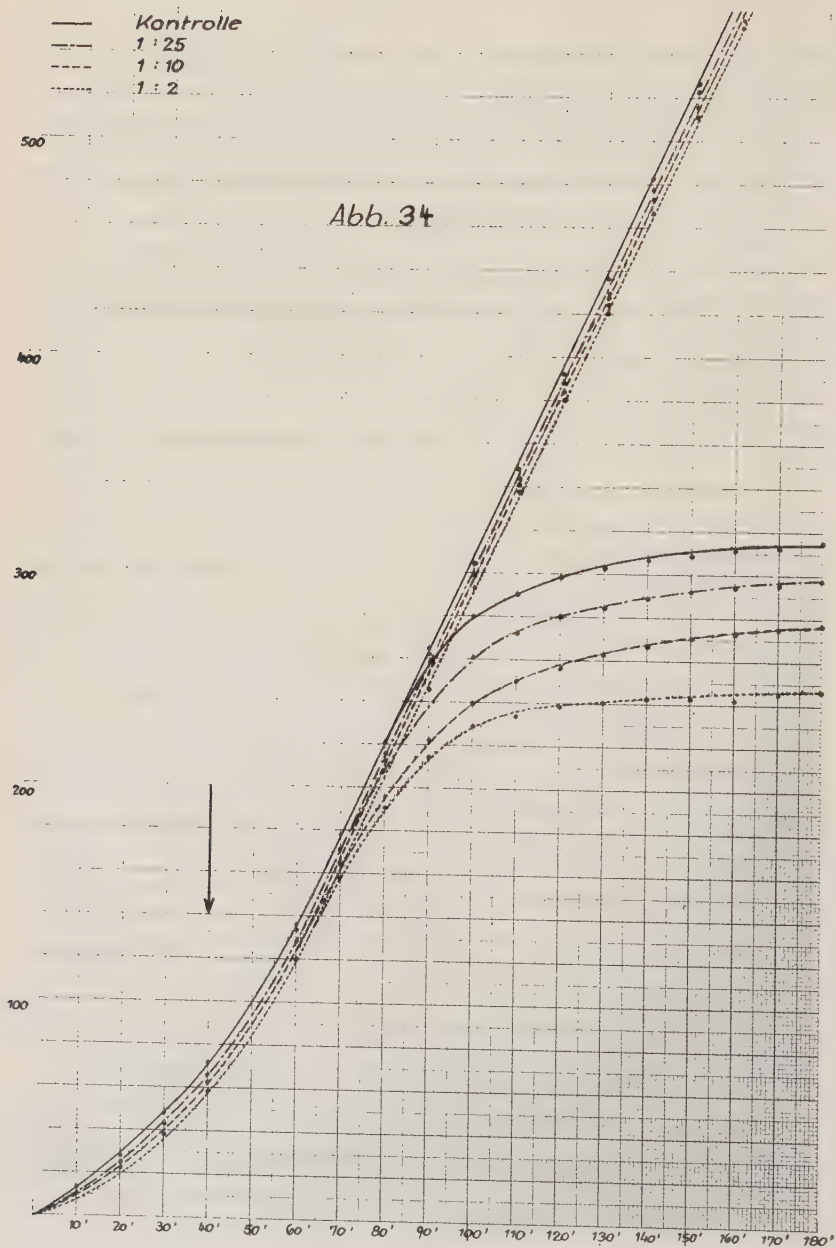
1 : 2

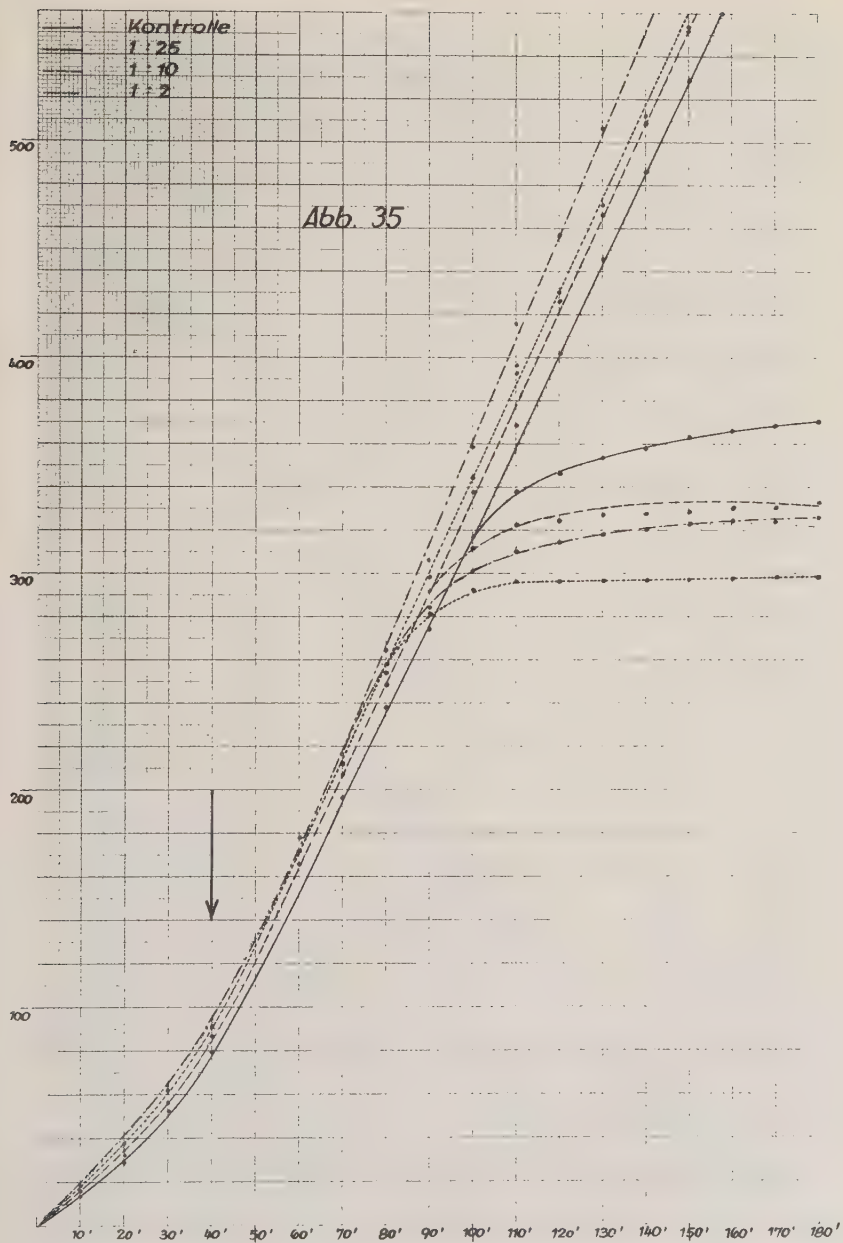
Abb 33



— Kontrolle
 - - - 1 : 25
 - - - 1 : 10
 - - - 1 : 2

Abb. 34





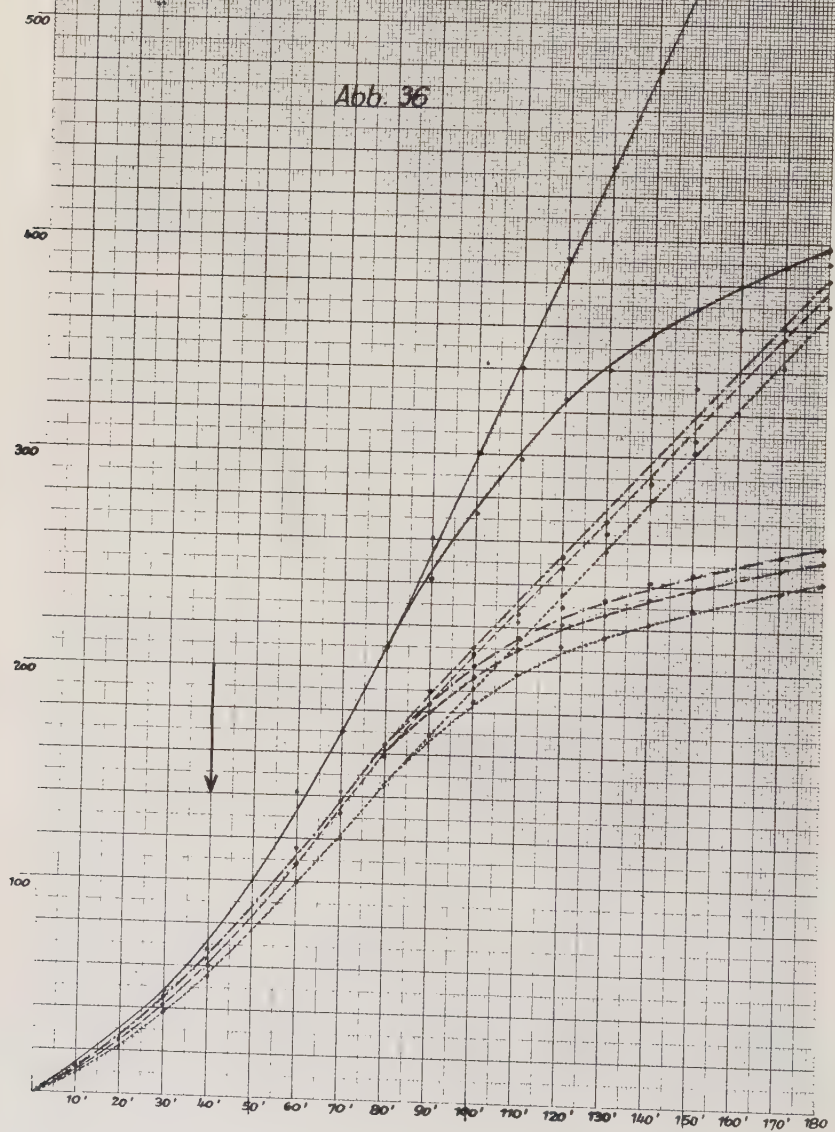
Kontrolle

1 : 25

1 : 10

1 : 2

Abb. 36



- Kontrolle
- 1 : 25
- - - 1 : 10
- · - · 1 : 2

Abb. 37

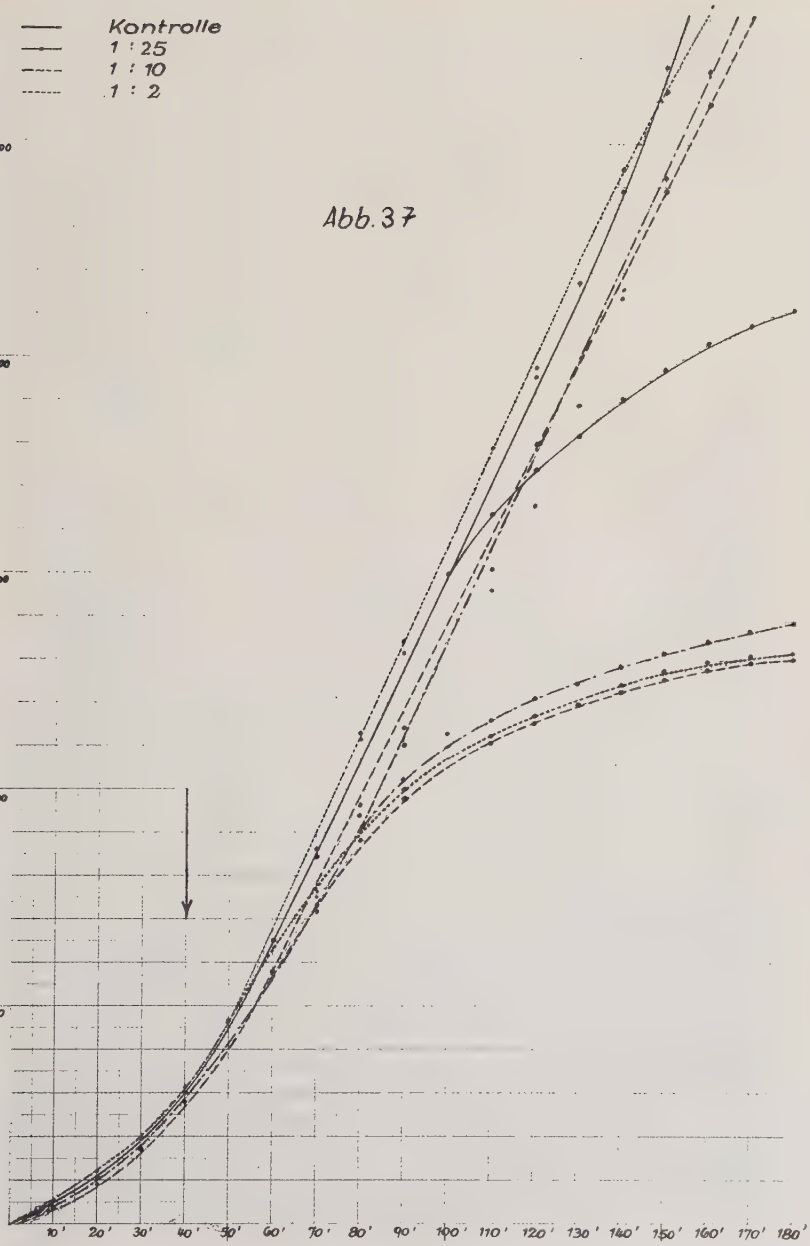
500

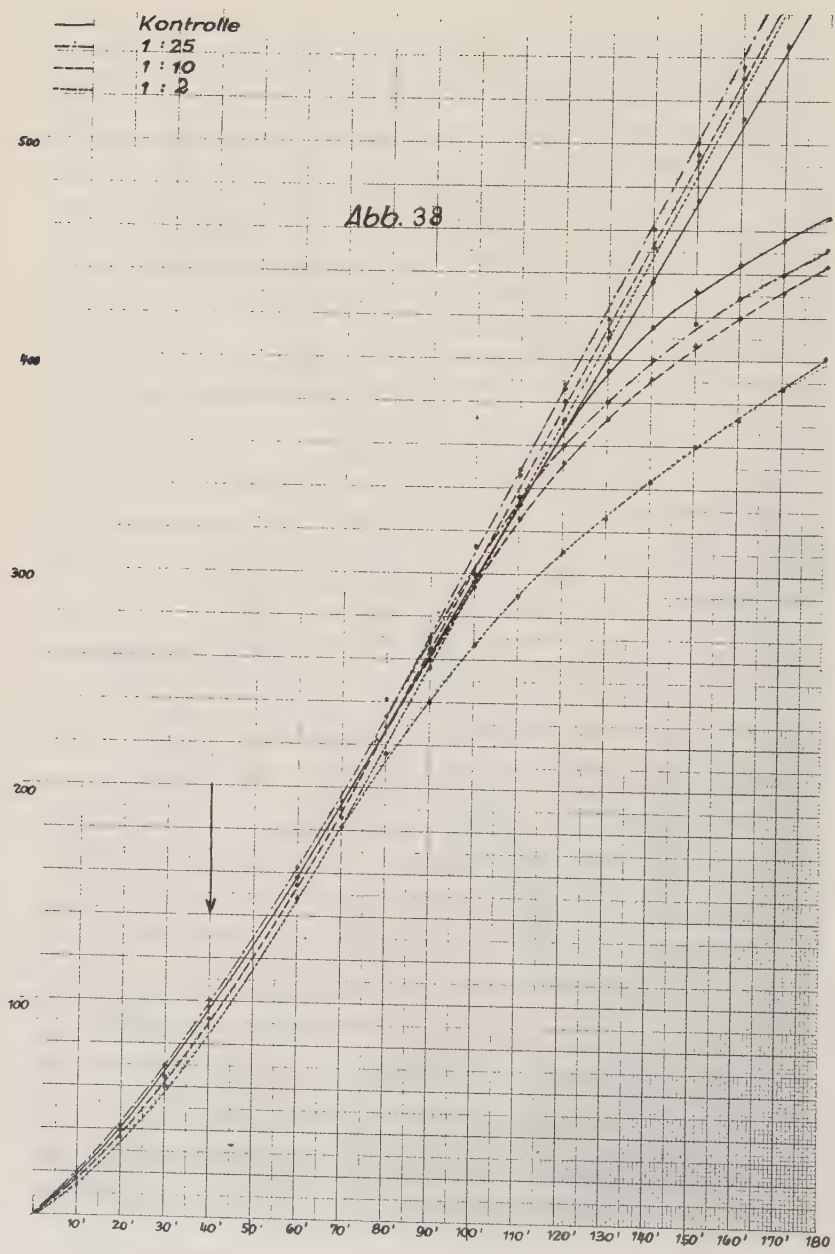
400

300

200

100





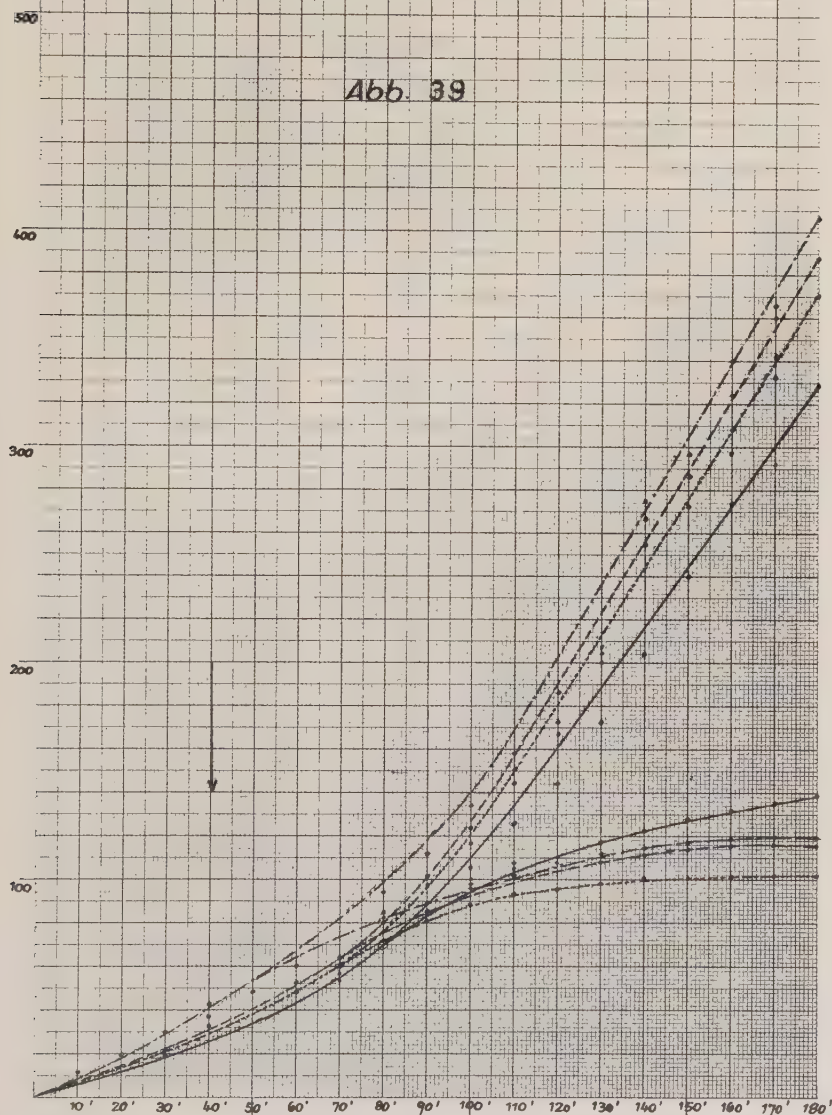
Kontrolle

1 : 25

1 : 10

1 : 2

Abb. 39



Versuch 22: In diesem Versuch wurde Humanalbumin gegen denselben Testkeim Re 1875 ausgetestet (Endkonz. wie Vers.21). Die Ergebnisse sind in Abb.37 wiedergegeben. Daraus ist zu entnehmen, daß die geringen Abweichungen der "Serumkurven" von der Kontrolle kaum als beweisend angesehen werden können. Der Pc-Effekt wird aber deutlich verbessert, wobei eine Abhängigkeit von der Albuminkonzentration angedeutet ist.

Versuch 23: In diesem Versuch wurde der Einfluß des Albumins aus Has auf den nicht-penasebildenden Stamm Sg 40 untersucht (Keimendkonz. = 4×10^8 K/ml, Pc-Endkonz. = 750 E Pc/ml). Die Ergebnisse sind in Abb.38 aufgezeichnet. Aus dieser Abbildung ist zu entnehmen, daß die verschiedenen Konzentrationen von Albuminen aus dem Has die Stoffwechselkurven praktisch nicht beeinflussen. Dagegen wird der Pc-Effekt in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration verstärkt.

Versuch 24: In diesem Versuch wurde humanes Albumin gegen Sg 40 getestet (Endkonz. wie bei Versuch 23). Aus Abb.39 ist zu entnehmen, daß mit den Ansätzen, die das Humanalbumin enthalten, ein höherer O_2 -Verbrauch gemessen wurde. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß die Ausgangswerte in diesen Ansätzen schon etwas höher lagen im Gegensatz zu den sonstigen Versuchen. Es darf deswegen angenommen werden, daß Humanalbumin in den hier verwandten Konzentrationen keinen Einfluß auf den O_2 -Verbrauch hat. Der Pc-Effekt wird in Abhängigkeit von der Serumkonzentration deutlich, wenn auch nicht so ausgeprägt wie sonst, verbessert.

5. DISKUSSION

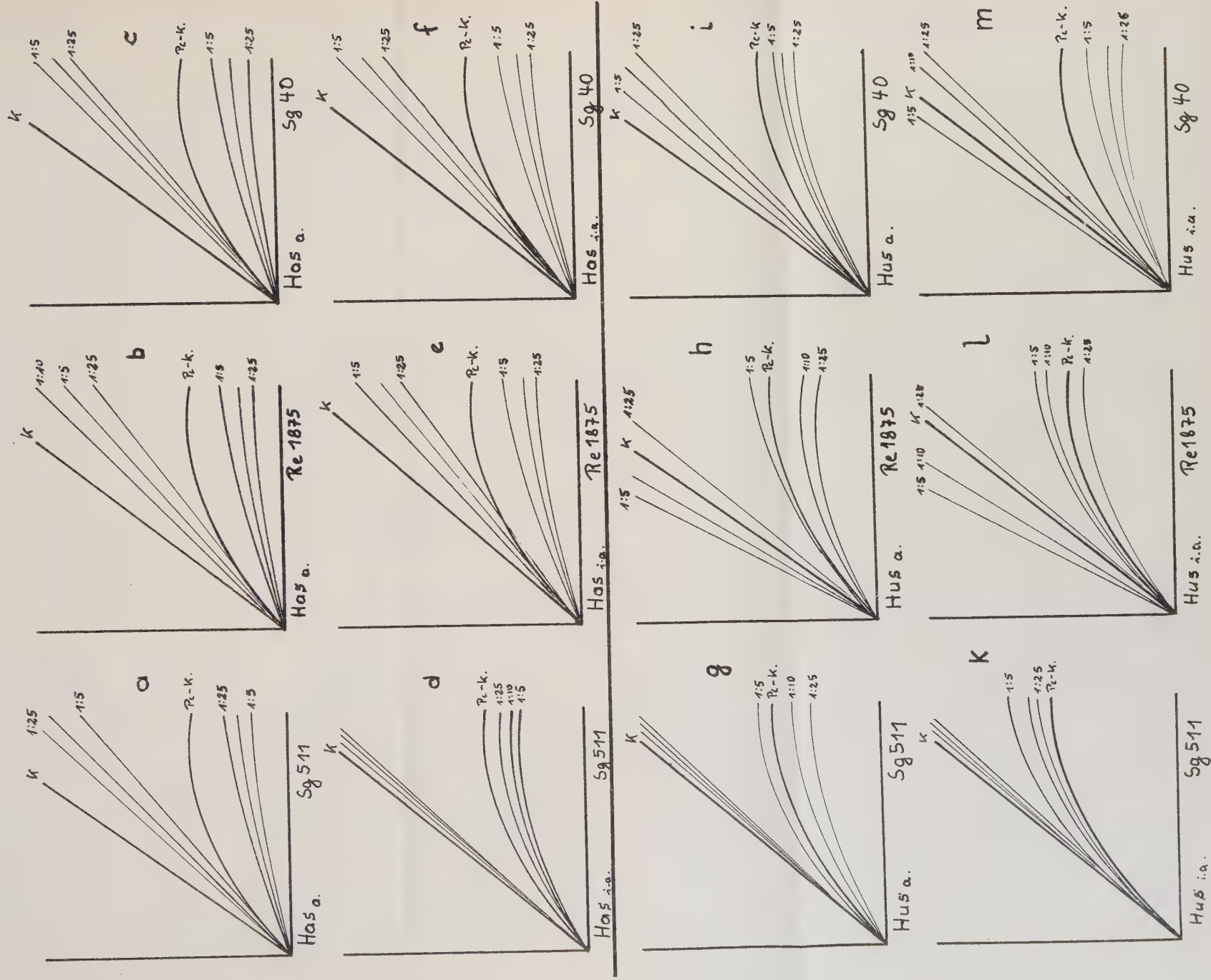
Vor einer zusammenfassenden Besprechung der Ergebnisse im einzelnen sei ein kurzer schematischer Überblick über die Warburgversuche gegeben

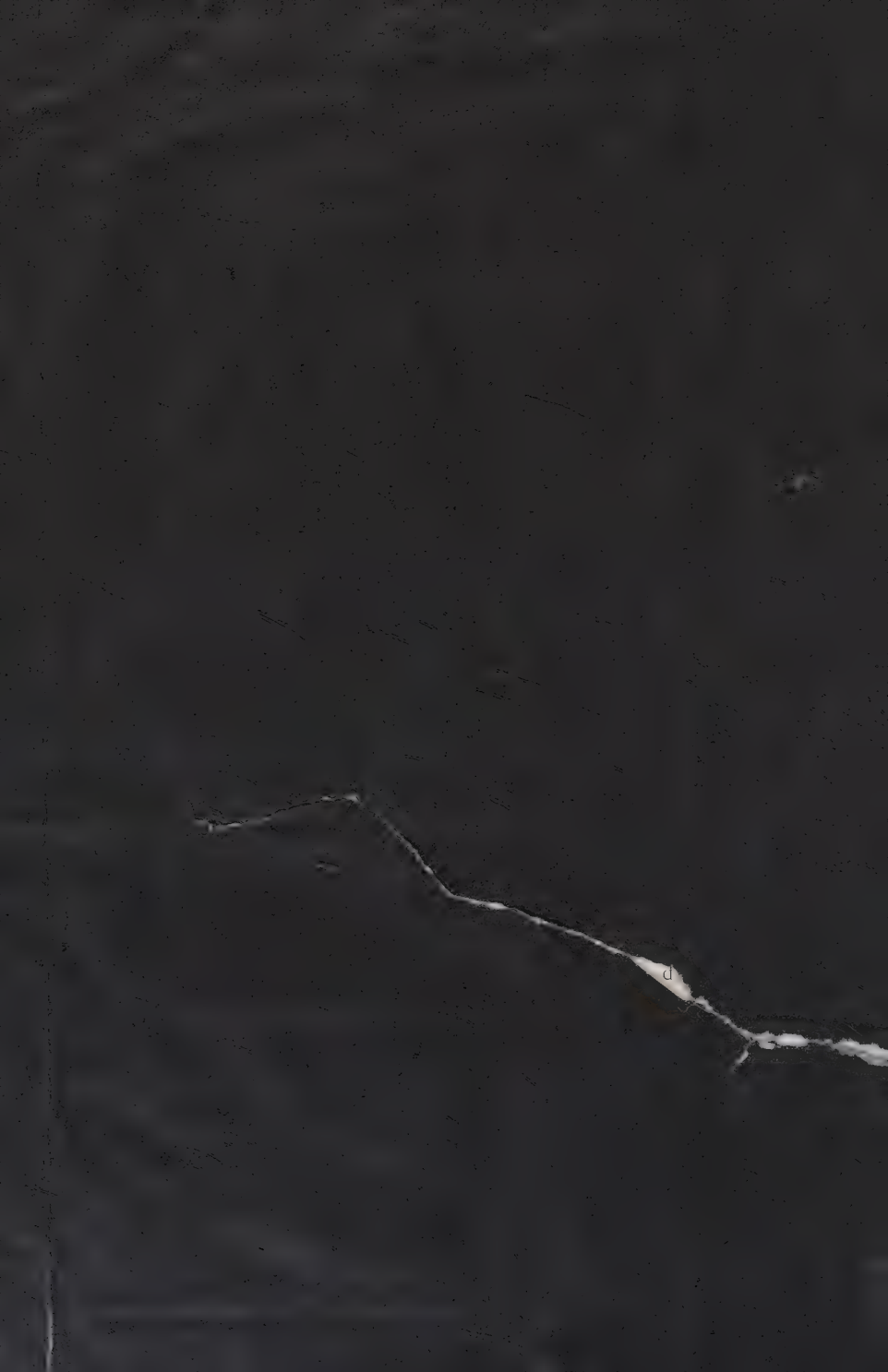
Aus den Abbildungen 40 a - y ist zu entnehmen, daß bei Verwendung von Hammelserum (= Has) eine thermische Inaktivierung keinen Einfluß auf das Testergebnis hat. In diesem Fall können also die beiden Testreihen zusammen besprochen werden (Abb. 40 a-c und d-f). Es sei ferner darauf hingewiesen, daß die meisten Versuchsreihen zweimal durchgeführt wurden. Die Ergebnisse waren identisch, was für den Aussagewert der gemachten Beobachtungen spricht. Has bewirkt bei dem Pc-sensiblen Stamm Sg 511 eine konzentrationsabhängige Minderung des O_2 -Verbrauchs. Der Pc-Effekt wird ebenfalls in Abhängigkeit von der Serumkonzentration erhöht. Die Ergebnisse mit inaktivem Serum sind prinzipiell gleichartig, jedoch nicht so ausgeprägt.

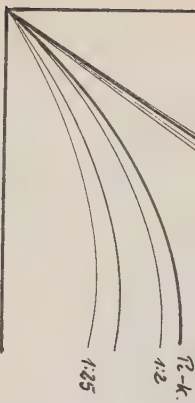
Anders verhalten sich die beiden Pc-resistenten Staphylokokkenstämme, von denen der eine Penase bildete. In beiden Fällen wurde bei mehrfachen Ansätzen festgestellt, daß der stärkste Hemmeffekt durch die kleinste Serumkonzentration ausgelöst wurde. Auch die Pc-Wirkung wird im Hinblick auf den O_2 -Verbrauch durch die kleinste Serumkonzentration erhöht.

Fragt man nach der wirksamen Serumkomponente, dann zeigen die Versuche mit γ -Globulinen und Albuminen vom Hammel, daß bei dem Pc-sensiblen Stamm Sg 511 die Ergebnisse denen mit Vollserum gleichen. Bei den beiden Pc-resistenten Stämmen kann aber festgestellt werden, daß mit und ohne Pc im Ansatz eine Hemmung des O_2 -Verbrauchs in Abhängigkeit von der Globulinkonzentration auftritt, also nicht so wie bei Verwendung von Vollserum. Albumine aus Has haben bei den Pc-Versuchen einen dem Globulin vergleichbaren, wenn auch meist nicht so ausgeprägten Effekt. Wird dagegen der Einfluß von Albuminen ohne Pc untersucht, dann entsprechen die Kurven für den O_2 -Verbrauch bei dem Pc-sensiblen Stamm Sg 511 und bei dem Pc-resistenten nicht-penasebildenden Stamm Sg 40 etwa denen der Kontrolle ohne Serumzusatz. Nur der Penasebildner zeigt ein ähnliches Bild wie bei Verwendung von Globulinen. Die letztgenannte Ausnahme dürfte kein Zufallsbefund sein, da sich das Ergebnis reproduzieren ließ.

Die Ergebnisse mit aktivem und inaktivem Humanserum entsprechen sich im Prinzip (Abb. 40 g-i und k-m). Die mit diesen beiden Seren erhaltenen Kurven unterscheiden sich nur in einer meist nicht ausgeprägten Verschiebung der Kurvenbündel. Hus bewirkt bei dem Pc-sensiblen Stamm Sg 511







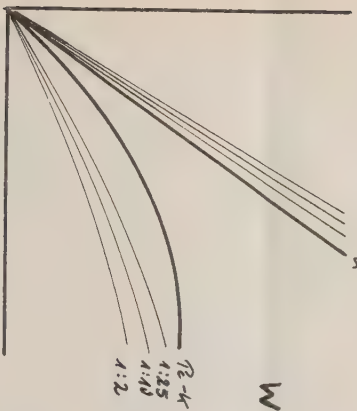
Hus y-Glob. Wg 511



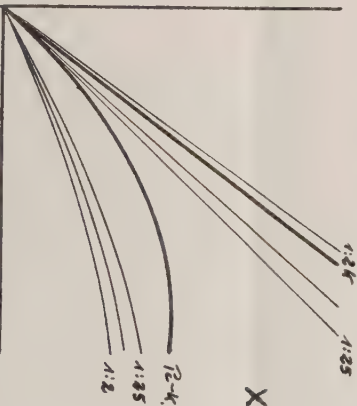
Hus y-Glob. Re 1875



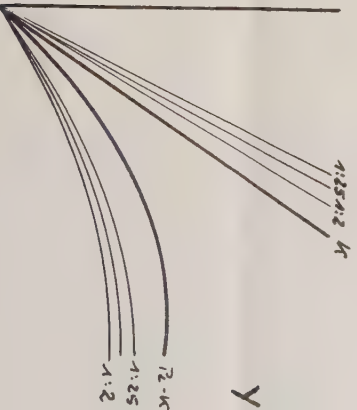
Hus y-Glob. Sg 40



Hus y-Glob. Wg 511



Hus y-Glob. Re 1875



Hus y-Glob. Sg 40

Zeichenerklärung

Has = Hammelserum

Hus = Humanserum

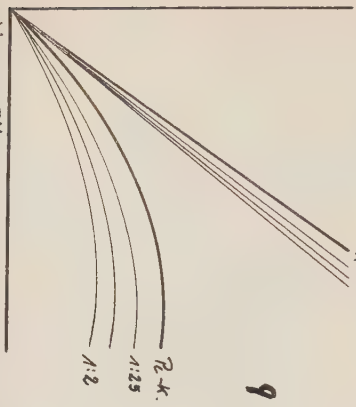
a = aktiv

ia. = inaktiv

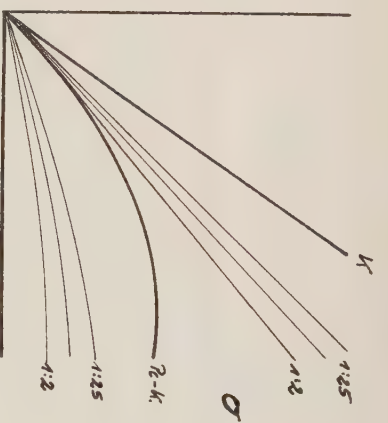
k = Kontrolle



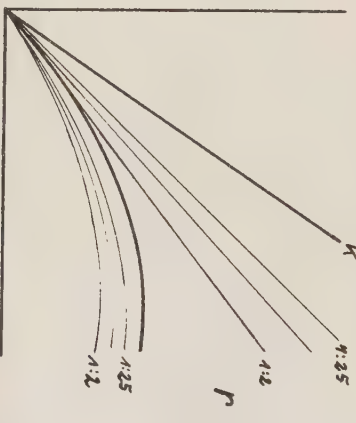
Has γ -Glob Sg 511



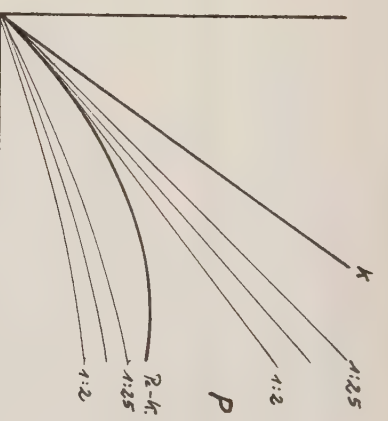
Has Rlb Sg 511



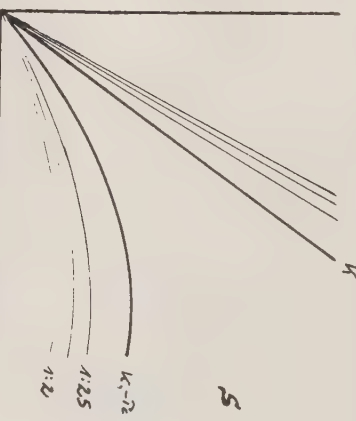
Has γ -Glob Re 1875



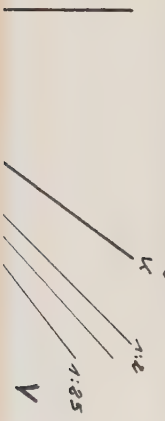
Has Rlb Re 1875



Has γ -Glob Sg 40



Has Rlb Sg 40



praktisch keine Beeinflussung des O_2 -Verbrauchs. Der Pc-Effekt wird aber durch aktives Serum der geringsten Konzentration am deutlichsten gefördert. Mit der höchsten Serumkonzentration kommt es dagegen zu einem höheren O_2 -Verbrauch als bei der Pc-Kontrolle ohne Serumzusatz. Mit inaktivem Serum und Pc kommt es zu einer Verschiebung des ganzen Kurvenbündels, und zwar in der Weise, daß die höchste Serumkonzentration den O_2 -Verbrauch deutlich fördert, was vergleichbar einer Resistenzerhöhung wäre (Abb. 40 k). Der Pc-resistente Penasebildner verhält sich in Anwesenheit von Humanserum ähnlich. Der resistente nicht-penasebildende Staphylokokkenstamm zeigt dieses Phänomen nicht, jedoch ist auch hier bei der höchsten Serumverdünnung die Hemmung des O_2 -Verbrauchs am deutlichsten. Man könnte daran denken, daß durch die Verdünnung ein Faktor nicht mehr so sehr zur Geltung kommt. In diesem Zusammenhang interessiert besonders der Einfluß der Globulin- und Albuminfraktion des Hus. Der Effekt von Humanglobulin auf den Pc-sensiblen Stamm Sg 511 entspricht im Prinzip dem des Vollserums. Dasselbe gilt für die beiden Pc-resistenten Stämme, von denen einer ein Penasebildner ist.

Änderungen ergeben sich aber bei Verwendung von Humanalbumin, und zwar bei allen 3 Teststämmen. Dies gilt besonders für den Pc-Versuch. Während bei Verwendung von Vollserum die größte Verdünnung den deutlichsten Effekt hat, wird mit Albumin der O_2 -Verbrauch in Abhängigkeit von der Albuminkonzentration gedämpft.

Es sei betont, daß diese bei 3 Stämmen übereinstimmenden Resultate gegen einen Zufallsbefund sprechen, ebenso wie die Reproduzierbarkeit der Versuche mit Vollserum.

Im Dilutionstest wurde die Pc-Sensibilität der 3 Teststämmen in Gegenwart von verschiedenen Serumkonzentrationen (Hammel) geprüft. Man gewann den Eindruck bei diesen Versuchen, daß die geringen Serumkonzentrationen eine, wenn auch praktisch noch in die Streubreite fallende Sensibilitätserhöhung auslösten. Dies könnte durchaus den Warburgversuchen entsprechen. Allerdings darf nicht vergessen werden, daß dieser Effekt beim Dilutionstest nicht sehr ausgeprägt war, so daß eine sichere Beziehung zwischen den mit den beiden Methoden ermittelten Resultaten keineswegs behauptet werden kann.

Vergleicht man die Beeinflussung der Wachstumskurven von Sg 511 durch aktives und inaktives Hammelserum und Menschen Serum mit dem entsprechenden Versuch über den O_2 -Verbrauch, dann stimmen diese Ergebnisse

ebenfalls überein. Durch Has wird in Abhängigkeit von der Konzentration der Stamm Sg 511 gehemmt, nicht aber durch Hus.

Die Angaben von Hiller und Schach, daß humanes Albumin das Wachstum von Staphylokokken nicht beeinflußt, ist für den Fall von Sg 511 durch unsere Versuche bestätigt worden.

Die Ergebnisse dürften durch diese mehrfachen Absicherungen als gültige Aussagen angesehen werden, wenn dadurch natürlich auch viele Fragen neu auftauchen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Untersucht wurde der Effekt von aktivem und inaktivem Hammel- und Humanserum sowie der entsprechenden Albumin- und γ -Globulinfraktion auf den O_2 -Verbrauch von drei Stph.aureus-Stämmen. Davon war ein Stamm Pc-sensibel, ein weiterer Pc-resistent und nicht-penicillinasebildend und der dritte Stamm ein Penicillinasebildner. Gemeinhin kam es zu einer Minderung des O_2 -Verbrauchs und in dieser Hinsicht auch zu einer Erhöhung des Pc-Effektes. Unterschiedliche Ergebnisse bei den verschiedenen Versuchsreihen konnten abgesichert werden und wurden diskutiert.

Die Bestimmung der Generationszeit unter den gleichen Bedingungen ergab vergleichbare Resultate.

7. LITERATUR

- Alexander, H. E. und G. Leidy: Mode of action of streptomycin on type bH. influenzae. - J. exp. Med. 85, 329 (1947)
- Antweiler, H. J.: Die quantitative Elektrophorese in der Medizin. - Springer-Verlag, Berlin, Göttingen, Heidelberg (1957)
- Bondi, A. und C. C. Dietz: Relationship of Penicillinase to Action of Penicillin. - Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 56, 135 (1944)
- Bondi, A. und J. Kornblum und O. de St. Phalle: The Aminoacid requirement of penicillin-resistant und penicillin-sensitive strains of micrococcus. - J. Bact. 68, 617 (1954)
- Boniece, W. S.: Nutritional requirements of staphylococci with in vivo acquired antibiotic resistance, grown in a minimal medium. - Antibiot. and Chemother. 6, 209 (1956)
- Braun: Bacterial genetics. - Philadelphia and London: W. B. Saunders Co. (1953)
- Colowick, S. P. and N. H. Price: Guanin as a coenzyme in enzymatic transphosphorylation. - J. Biol. Chem. 59, 563 (1945)
- Ettlinger, L.: Wirkungsweise und Wirkungsmechanismus der Antibiotika. - Schweizer med. Wschr. 12, 271 (1955)
- Ephrussi-Taylor, H.: Genetic mechanism of bacteria and bacterial viruses III. Genetic aspects of transformations of pneumococcus. - Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 16, 445 (1951)
- Fisher, M. W. and M. C. Manning: Synergism between human gamma globulin and chloramphenicol in the treatment of experimental bacterial infections. - Antibiot. and Chemother. 7, 315 (1957)
- Fisher, M. W. and M. C. Manning: The specific antibody nature of the therapeutic action of γ -Globulin in experimental bact. infection in mice. - Antibiot. Ann. 58, 572 (1957)
- Fust, B. and E. Böhm: Beitrag zum Problem der Resistenz- und Sensibilitätsprüfung gegen Antibiotika und Sulfonamide. - Bull. d. Schweiz. Akad. med. Wissenschaften Vol. 13 (1957) Fasc. 5/6, p. 560

- Gale, E. F. and A. W. Rodwell: The assimilation of aminoacid by bacteria. The nature of resistance to penicillin of staph. aureus. - J. gen. Microbiol. 3, 127 (1949)
- Gillissen, G. und Gillissen, I. M.: Resistenzbildung bei Mikroorganismen. - Ergebnisse d. Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie, Springer-Verlag, 33, 128 (1960)
- Gladstone, G. P.: The nutrition of Staph. aureus: nitrogen requirements. - Brit. J. Exp. Path. 18, 322 (1937)
- Goudlow, R. J., L. Tucker, W. Braun a. R. Nika: Effect of the isomeric configuration of the source of nitrogen on chances in populations and metabolism in cultures of brucella. - J. Bact. 63, 681 (1952)
- Goudlow, R. J. und Mitarbeiter: The role of d-alanine in the growth and variation of Brucella abortus. - Arch. Biochem. 30, 402 (1951)
- Grassmann und Hannig: Dtsch. med. Wschr. 76, 333 (1951)
- Haas, G. J. and M. G. Sevag: Critical role of aminoacids on the sensitivity and development of resistance to polymyxin B. - Arch. Biochem. 43, 11 (1953)
- Haight und Mitarbeiter: Resistance of bacteria to erythromycin. - Proc. Soc. exp. Biol. (NY) 81, 183 (1952)
- Hallmann, L. und J. Rieser: Soll die Bakteriensensibilität getestet werden? - Dtsch. med. Wschr. 22, 880 (1954)
- Hewitt: -- Biochem. J. 32; 1540, 1555 (1938)
- Hiller, E. und H. Schach: Neue Erkenntnisse über den Wirkungseffekt des menschlichen Albumins. - Münch. med. Wschr. 96; 1083, 1118 (1954)
- Hinshelwood, C. M.: The chemical kinetics of the bacterial cell. - Oxford 1946
- Hoerlein, D. F.: Inhibiting effect of normal serum and its gamma globulin-fraction upon the variation of staph. aureus. - J. Bact. 56, 139 (1948)
- Holper, C. J., C. J. Rickher and J. C. Sylvester: Ristocetin: effect of gamma-globulin on in vivo activity. - Antibiot. Ann. NY 581 (1958)
- Karte, E. und E. Kröger: Bakteriologische Untersuchungen mit Albumin und Gammaglobulin aus menschlichem Serum. - Dtsch. med. Wschr. 12, 420 (1955)

- Knouf, E. G.: The combined use of γ -globulin and chloramphenicol in the treatment of refractory infections (a report of ten cases). - Antibiot. Ann. 5, 85 (1958)
- Kriegel, H. und E. Spode: Strahlentherapie 103/1 145 (1957)
- Kushner, D. J.: The basis of chloramphenicol-resistance in *Pseudomonas fluorescens*. - Arch. Biochem. 58, 347 (1955)
- Lam, G. J. and M. G. Sevag: Mechanism of the development of resistance to streptomycin. - VI. Biochemical differences of replica colonies. - J. Bact. 69, 184 (1955)
- Leuthardt, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. - W. de Gruyter-Verlag, Berlin (1957), p. 562.
- Manning, M. C., L. A. Gagliary and M. W. Fisher: The therapeutic activity of gammaglobulin-chloramphenicol combinations in mouse infections due to *Salmonella*, *Pneumococci*, *E. coli* or *Pasteurella*. - Antibiot. Ann. 566 (1958)
- Mayer-Harting, A.: The acquisition of penicillin resistance by staph. aureus strain. - Oxford J. gen. Microbiol. 13, 9 (1955)
- McCarthy, M., H. E. Taylor and O. T. Avery: Biochemical Studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types. - Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 11, 177 (1944)
- Oberman, J. W., K. O. Gregory, S. Ross and F. G. Burke and E. C. Rice: The incidence of low serum levels of gammaglobulin in diseases occurring during infancy and childhood. - Antibiot. Ann. 593 (1958)
- Ramsey, H. H. and J. W. Padron: Altered growth requirements accompanying chloramphenicol resistance in *micrococcus pyog. var. aureus*. - Antibiot. and Chemother. 4, 527 (1954)
- Reedy, R. J., E. J. Oswald and W. W. Wright: The effect of gammaglobulin and specific antiserum combined with antibiotics in experimental infections in mice. - Antibiot. Ann. 581 (1958)
- Ritzerfeld, W.: Untersuchungen über die Resistenzwerte von Microorganismen bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. - Arch. für Hygiene und Bacteriologie, Bd. 139, Heft 5, 332 (1955)
- Rosanoff, E. I. and M. G. Sevag: The role of aminoacids in the development of resistance to streptomycin. - Bact. Proc. 56 (1951)

- Sauberlich, H. E. and C. A. Bauman: J. Biol. Chem. 176, 165 (1948)
- Schmidt, H.: Fortschritte der Serologie. - Verlag Dr. Dietrich Steinkopff, Darmstadt 1955, 2. Auflage, p. 278, 315 ff.
- Schultze, H. E.: Die Plasmaeiweißkörper im Blickfeld des Chemikers. - Angew. Chemie 62, 395 u. 426 (1950)
- Schultze, H. E., M. Schönberger und H. D. Matheka: Zur Kenntnis der Gamma-Globuline und antitoxischen Immunglobuline. - Behringwerk Mitteilungen 26, 21 (1952)
- Schwartzman, G.: Studies on the nature of resistance of gramnegative bacteria to penicillin. Antagonistic and enhancing effects of aminoacids. - J. exp. Med. 83, 65 (1946)
- Scott, G. W.: Spontaneous mutation to streptomycin resistance in E. coli. - Brit. J. exp. Path. 30, 501
- Sevag, M. G. and E. J. Rosanoff: Mechanism of the development of resistance to streptomycin. I. Origin of resistant strains. - J. Bact. 63, 243
- Smolens, J. and A. B. Vogt: Studies on antibiotic resistance and the nucleic acid content of bacteria. - J. Bact. 66, 140 (1953)
- Snell, E. E., E. Kitay and W. S. McNutt: - J. Biol. Chem. 75, 475 (1948)
- Sonneborn, T. M.: The determination of hereditary antigenic differences in genetically identical paramecium cell. - Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 34, 413 (1951)
- Squires, R. W. und S. E. Hartsell: Journ. Bact. 69, 226 (1955)
- Steers and Sevag: Mechanism of resistance to sulfonamids; comparative study of amino acid metabolism of staph. aureus in relation to mechanism of resistance. - Arch. Biochem. 24, 129 (1949)
- Svensson, J.: Biol. Chem. 139, 805 (1941)
- Tiselius, A.: Biochem. J. 31, 1464 (1939)
- Turba, F.: Chromatographische Methoden in der Proteinchemie. - Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1954
- Waisbren, B. A.: The Treatment of bacterial infections with the combination of antibiotics and gammaglobulin. - Antibiot. and Chemother. 7, 3

Welsch, M. : Quelques aspects de la résistance du staphylocoque à la streptomycine. - C.R. Soc. Biol. (Paris) 143, 1282 (1949)

Wuhrmann und Wunderly: Die Bluteiweißkörper des Menschen. - Benno Schwabe & Co Verlag, Basel 1952

Zink, A. O. : Neuere Erkenntnisse und Gesichtspunkte in der antibiotischen Therapie. - Therapiewoche 4-5/6, 113 (1953)

Herrn Professor Dr. K l i e w e möchte ich dafür danken, daß ich in seinem Institut arbeiten durfte.

Herrn Professor Dr. Dr. G i l l i s s e n meinen herzlichen Dank für die Überlassung dieses Themas.

Besonderen Dank auch Fräulein E. H e u s e l, die mir bei der technischen Durchführung der Arbeit behilflich war.

LEBENS LAUF

Am 23.7.1936 wurde ich, Marga Ingeborg Wernicke als älteste Tochter des Regierungs- und Vermessungsrates Wilhelm Wernicke und seiner Ehefrau Ruth, geb. Christoffel, in Worbis (Eichsfeld) geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Worbis und Mielau (Südostpreußen), wohin mein Vater 1940 versetzt wurde. 1945 flüchteten wir nach Weimar und zogen dann wieder nach Worbis. In Mielau und Worbis besuchte ich die Grundschule bis einschließlich der 8.Klasse. Da die Existenz meines Vaters gefährdet war, verließen wir Worbis und zogen nach Alzey (Rhh.). Hier besuchte ich die Realschule und dann das neusprachl. und naturwissenschaftl. Gymnasium, in dem ich auch 1956 die Reifeprüfung bestand.

Im Mai 1956 begann ich mit dem Studium der Medizin. Ich studierte in Mainz und Freiburg. Im August 1958 bestand ich mein Physikum an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz. Im Sommer 1961 möchte ich das Staatsexamen an der gleichen Universität ablegen, um dann den ärztlichen Beruf zu ergreifen.

